

令和元年6月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05308

研究課題名(和文) 肺がんの髄膜がん腫症における分子標的薬耐性を克服する研究

研究課題名(英文) Study to circumvent targeted drug resistance in leptomeningeal carcinomatosis of lung cancer

研究代表者

矢野 聖二 (Yano, Seiji)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異肺がんの髄膜がん腫症モデルで、MET遺伝子コピー数増加が第1世代EGFR-TKI耐性を誘導し、MET阻害薬の併用により耐性を克服できることを明らかにした。また同モデルで第3世代EGFR-TKIの獲得耐性を誘導する2つの遺伝子変異を同定した。ALK肺がんの同モデルでEGFRリガンドであるアンフィレグリンがALK-TKIアレクチニブの獲得耐性を誘導し、EGFR-TKIの併用により耐性を克服できることを明らかにした。NTRK1融合遺伝子陽性がん細胞の脳転移モデルで、NTRK1-G667C変異がTRK-A阻害薬エントレクチニブ耐性を誘導し、フォレチニブが耐性を克服できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、肺がんの髄膜がん腫症における分子標的薬耐性の新たなメカニズムが同定されるとともに治療法の候補が見つかったことから、近い将来耐性克服を目指す臨床試験が行われ成果が患者に還元される可能性が生まれた。

研究成果の概要(英文)：In the leptomeningeal carcinomatosis (LMC) model of EGFR mutated lung cancer, we demonstrated that MET copy number gain caused resistance to 1st generation EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKI) and that combined use of MET inhibitor overcame the resistance. We also discovered 2 mutations which caused resistance to 3rd generation EGFR-TKI, osimertinib, in the LMC model. In the LMC model of ALK-rearranged lung cancer, we found that amphiregulin, an EGFR ligand, induced resistance to ALK-TKI alectinib and that combined use of EGFR-TKI overcame the resistance. In the brain metastasis model of NTRK1-rearranged cancer, we showed that NTRK1-G667C mutation caused resistance to TRK-A inhibitor entrectinib and that foretinib circumvent the resistance.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：分子標的薬耐性 髄膜がん腫症 EGFR-TKI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

髄膜がん腫症や脳転移などの中枢神経系(CNS)転移は肺がんの20~30%に発生し、頭痛や神経障害などを惹起して患者のQOLを著しく低下させる。EGFR変異肺がんやEML4-ALK肺がん(ALK肺がん)では、髄膜がん腫症や脳転移に分子標的薬が一旦は奏効するが、高頻度にCNS転移が耐性獲得による病勢増悪の場となることから、CNS転移は分子標的治療のsanctuary siteとよばれている。

EGFR変異肺がんに対するEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)としては、既に認可されている第1世代のゲフィチニブ/エルロチニブと第2世代のアファチニブに加え、第3世代のAZD9291(オシメルチニブ)が2015年末にも認可の見通しである。第3世代EGFR-TKIは、第1/2世代EGFR-TKIの耐性を惹起するEGFR-T790M変異に対しても有効であり、今後EGFR変異肺がん治療の主軸になることが予想されるが、髄膜がん腫症に対する効果は明らかではない。一方、ALK肺がんに対するALK-TKIとして第1世代のクリゾチニブと第2世代のアレクチニブが認可されているが、これらに対しても髄膜がん腫症における獲得耐性が生じることが予想される。

脳転移病変に対しては、分子標的薬を継続しながら脳病変に定位放射線照射を行うことで全身の腫瘍病勢制御が可能である。しかし、分子標的薬に耐性となった髄膜がん腫症には有効な治療が全くなく、髄膜がん腫症に対する有効な治療法の確立は急務の課題である。そのためには、髄膜がん腫症における分子標的薬耐性の分子機構を理解する必要があるが、その耐性機構は全く明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、独自に確立した髄膜がん腫症のin vivoイメージングモデルを用い、EGFR変異肺がんおよびEML4-ALK肺がんの髄膜がん腫症における分子標的薬の獲得耐性の分子機構を解明し、治療標的を同定するとともに、耐性克服に向けた治療法のproof of conceptを示すことを目的として実施した。

## 3. 研究の方法

**(1) 髄膜がん腫症において分子標的薬耐性を獲得した細胞株の樹立:** ルシフェラーゼ遺伝子導入したEGFR変異肺がん細胞株PC-9(PC-9/ffluc)あるいはEML4-ALK陽性肺がん細胞株A925PE3をSHOマウスの髄腔に移植し、約1週後にルシフェリン投与によりIVISシステムで髄腔の発光を確認し、それぞれEGFR-TKIであるゲフィチニブとALK-TKIであるアレクチニブを連日経口投与した。週2回IVISで発光をモニタリングしながら、髄膜がん腫症においてゲフィチニブ耐性あるいはアレクチニブ耐性を誘導した。耐性化したマウスの髄腔から回収したがん細胞をin vitroで培養し、それぞれPC-9/LMC-GRとA925L/ARを樹立した。

**(2) in vitroにおける耐性メカニズムの解析:** RTKアレイおよびWestern blotにより活性化している受容体を同定した。種々のサイトカイン発現をELISA法で検討した。遺伝子増幅の有無をFISH法およびPCR法で検討した。細胞増殖はMTT法で検討した。

**(3) 耐性因子に対する阻害薬のEGFR-TKI耐性克服作用の検討:** (1)で樹立した耐性細胞株に耐性因子を阻害する薬剤とEGFR-TKIやMET-TKIなどを添加し、72時間後の細胞生存をMTT法で検討した。

**(4) in vivoにおけるMET阻害薬のEGFR-TKI耐性克服作用の検討:** 耐性細胞株およびそれぞれの親株をSHOマウスの髄腔に移植し、ゲフィチニブを連日経口投与した。IVISでモニタリングを行い耐性が獲得された時点で、耐性因子に対する阻害薬を上乗せし、髄膜がん腫症が改善するか否かを検討した。

**(5) 耐性因子の臨床的関与の検討:** EGFR-TKI耐性あるいはALK-TKI耐性の髄膜がん腫

症患者等から採取した臨床検体（72 検体）を用い、上記 *in vivo* イメージングモデルで抽出した耐性因子の発現を測定し、耐性因子の臨床的関与を検討した。

**(6) *NTRK1* 融合遺伝子陽性がん細胞の脳転移モデルにおける TRK 阻害薬に対する耐性機構の解明**：*NTRK1* 融合遺伝子を有するヒト大腸がん細胞株 KM12SM を用い、上記の(1)～(4)と同様の手法で解析をした。

#### 4. 研究成果

(1) *EGFR* 変異肺がんの髄膜がん腫症のモデルにおける第 1 世代 *EGFR*-TKI 獲得耐性機構の解明と耐性克服治療の開発：*EGFR* 変異肺がん細胞株 PC-9/ffluc を SHO マウスの髄腔に移植したのち、ゲフィチニブを連日経口投与することで、髄膜がん腫症において獲得耐性となった細胞株 PC-9/LMC-GR を樹立した。PC-9/LMC-GR は、*MET* 受容体遺伝子コピー数増加により *MET* のリン酸化が亢進し、ゲフィチニブに中等度耐性を示した。*MET* 阻害薬を併用することで PC-9/LMC-GR のゲフィチニブ感受性を回復させることができた。

次に、*in vivo* で髄膜がん腫症におけるゲフィチニブ耐性が *MET* 阻害薬併用により解除できるか否かを検討した。PC-9/ffluc を移植した髄膜がん腫症マウスにゲフィチニブを連日投与し耐性を誘導した後、*MET* 阻害薬（クリゾチニブ）による治療を上乗せすることにより髄膜がん腫症は著明に改善した。以上より、*in vivo* においても髄膜がん腫症におけるゲフィチニブ耐性を *MET* 阻害薬併用により解除できることが明らかとなった。

(2) *EGFR* 変異肺がんの髄膜がん腫症のモデルにおける第 3 世代 *EGFR*-TKI 獲得耐性機構の解明：(1)と同様に、髄膜がん腫症モデルで第 3 世代 *EGFR*-TKI（AZD9291 オシメルチニブ）の獲得耐性を誘導し、耐性がん細胞株を得た。耐性株では、オシメルチニブに対し耐性を誘導することが知られている *EGFR*-C797S 変異は検出されなかった。しかし、親株と耐性株において次世代シーケンスを行い、耐性株にのみ発生していた 2 つの遺伝子変異（*EGFR* 以外に生じた変異）を同定した。現在、それらの遺伝子変異の機能解析を行っている。

(3) *ALK* 肺がんの髄膜がん腫症のモデルにおける *ALK*-TKI 獲得耐性機構の解明：*ALK* 肺がん（A925LPE3）の髄膜がん腫症モデルを確立し、*ALK* 阻害薬であるアレクチニブを約 100 日間連日経口投与し、再発した腫瘍から耐性株を樹立した。*in vitro* における解析で親株と比較し、耐性株は *EGFR* リガンドであるアンフィレグリンを高発現することで *EGFR* を活性化し、アレクチニブに耐性化していることを明らかにした。興味深いことに、この耐性株はアレクチニブ以外の *ALK* 阻害薬（クリゾチニブ、セリチニブ、ロルラチニブ）にも交叉耐性を示した。また、アレクチニブに *EGFR* 阻害薬を併用することで、耐性株の増殖を阻害できることを *in vitro* において示した。さらに、耐性株をマウスの髄腔に移植した髄膜がん腫症モデルでは、アレクチニブ単剤や *EGFR* 阻害薬単剤は無効であったが、アレクチニブと *EGFR* 阻害薬を併用することで髄膜がん腫症の進行を著明に抑制できた。以上より、EML4-*ALK* 肺がんの髄膜がん腫症の *ALK* 耐性のメカニズムの一つとしてアンフィレグリン発現上昇を同定し、*EGFR* 阻害薬の併用で耐性を克服できる可能性を示した。さらに、髄液臨床検体を収集し、*EGFR* 阻害薬耐性の髄膜がん腫症を発症した *EGFR* 肺がん患者の髄液と比較し、アレクチニブ耐性の髄膜がん腫症を発症した *ALK* 肺がん患者の髄液中には高濃度のアンフィレグリンが存在することを見出した。

以上より、われわれの LMC モデルを用いることにより臨床的に意義のある分子標的薬に対する耐性因子が同定できることが明らかになった。また、本研究で同定されたアンフィレグリンは臨床的にも重要な治療標的になることが示唆された。

(4) *NTRK1* 融合遺伝子陽性がん細胞の脳転移モデルにおける TRK 阻害薬に対する耐性機構の解明：*NTRK1* 融合遺伝子異常を有するがん細胞株(KM12SM)を用い、脳転移モデルを作成した。さらに、脳転移モデルにおいて TRK 阻害薬(エントレクチニブ)耐性を誘導し、耐性株(KM12SM-ER)を樹立した。耐性株は *NTRK1*-G667C 変異によりエントレクチニブ耐性を獲得していた。キナーゼ阻害薬ライブラリーを用いたスクリーニングでフォレチニブを耐性克服薬として抽出した。フォレチニブは、キナーゼ阻害プロファイルアッセイで TRK-A 阻害活性を有し、ドッキングシミュレーションで野生型よりも G667C 変異陽性の TRK-A に親和性が高いことが示された。エントレクチニブが無効な KM12SM-ER の脳転移モデルにて、フォレチニブは脳転移抑制効果を示すことを見出した。

以上のように、肺がんでも検出される *NTRK1* 融合遺伝子陽性がんの脳転移における分子標的薬耐性の分子機構を明らかにし、耐性克服薬の同定に成功した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Warashina S, Zouda M, Mukai H, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K. Detection and inhibition of HGF by a macrocyclic peptide and nanoimaging of its action. **Nat Chem Biol**, in press.
2. Taniguchi H, Yamada T, Wang R, Tanimura K, Adachi Y, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, AL, Boroni M, Yoshimura A, Shiotsu S, Matsumoto I, Watanabe S, Kikuchi T, Miura S, Tanaka H, Kitazaki T, Yamaguchi H, Mukae H, Uchino J, Uehara H, Takayama K, Yano S. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. **Nat Commun** 2019 Jan 16;10(1):259. doi: 10.1038/s41467-018-08074-0.
3. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Nakagawa T, Taniguchi H, Suzuki T, Yamada T, Nishihara H, Ninomiya H, Ishikawa Y, Baba S, Takeuchi K, Horiike A, Tanagitani N, Nishio K, Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. **Cancer Res**, 2019 79:1658-70.
4. Wang R, Yamada T, Arai S, Fukuda K, Taniguchi H, Tanimoto A, Nishiyama A, Takeuchi S, Yamashita K, Ohtsubo K, Matsui J, Onoda N, Hirata E, Taira S, Yano S. Distribution and efficacy of lenvatinib in brain metastasis of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune-deficient mice. **Mol Cancer Ther**, 2019 Mar 29. pii: molcanther.0695.2018. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0695. [Epub ahead of print]
5. Yamada T, Amann JM, Tanimoto A, Taniguchi H, Shukuya T, Timmers C, Yano S, Shilo K, Carbone DP. Histone deacetylase inhibition enhances the antitumor activity of a MEK inhibitor in lung cancer cells harboring RAS mutations. **Mol Cancer Ther** 2018 17:17-25.
6. Nishiyama A, Yamada T, Kita K, Wang R, Arai S, Fukuda K, Tanimoto A, Takeuchi S, Tange S, Tajima A, Furuya N, Kinoshita T, Yano S. Foretinib overcomes entrectinib resistance associated with the *NTRK1* G667C mutation in *NTRK1* fusion-positive tumor cells in a brain metastasis model. **Clin Cancer Res**, 2018 24:2357-2369.
7. Arasada RR, Shilo K, Yamada T, Zhang J, Yano S, Ghanem R, Wang W, Takeuchi S, Fukuda K, Katakami N, Tomii K, Ogushi F, Nishioka Y, Talabere T, Misra S, Duan W, Fadda P, Rahman

- MA, Nana-Sinkam P, Evans J, Amann J, Tchekneva EE, Dikov MM, Carbone DP. Notch3-dependent  $\beta$ -catenin signaling mediates EGFR TKI drug persistence in EGFR mutant NSCLC. **Nat Commun** 2018 Aug 10;9(1):3198. doi: 10.1038/s41467-018-05626-2.
8. Taniguchi H, Takeuchi S, Fukuda K, Nakagawa T, Arai S, Yamada T, Yamaguchi H, Mukae H, Yano S. Amphiregulin triggered EGFR activation confers crizotinib-resistance in a mouse model with EML4-ALK cancer and its circumvention with EGFR inhibitors. **Cancer Sci** 2017; 108:53-60.
  9. Nanjo S, Arai S, Wang W, Takeuchi S, Yamada T, Hata A, Katakami N, Okada Y, Yano S. *MET* copy number gain is associated with gefitinib resistance in leptomeningeal carcinomatosis of *EGFR*-mutant lung cancer. **Mol Cancer Ther**, 2017 16:506-515.
  10. Tanimoto A, Takeuchi S, Arai S, Fukuda K, Yamada T, Roca X, Ong ST, Yano S. Histone deacetylase 3 inhibition overcomes *BIM* deletion polymorphism-mediated osimertinib-resistance in *EGFR*-mutant lung cancer. **Clin Cancer Res**, 2017 23:3139-3149.
  11. Arai S, Kita K, Tanimoto A, Takeuchi T, Fukuda K, Sato H, Yano S. In vitro and in vivo anti-tumor activity of alectinib in tumor cells with NCOA4-RET. **Oncotarget** 2017; 8:73766-73.
  12. Tsunozuka Y, Tanaka N, Fujimori H, Togashi Y, Baba S, Takeuchi K, Katayanagi K, Kurumaya H, Kitade H, Atagi S, Yano S. The case of double primary lung adenocarcinomas with an EGFR mutation and ALK translocation successfully treated with alectinib at the post-surgical recurrence. **J Med Invest** 2017; 64(3.4): 305-7.
  13. Takeuchi S, Fukuda K, Yamada T, Arai S, Takagi S, Ishii G, Ochiai A, Iwakiri S, Itoi K, Uehara H, Nishihara H, Fujita N, Yano S. Podoplanin promotes progression of malignant pleural mesothelioma by regulating motility and focus formation. **Cancer Sci**. 2017 Jul;108(7):1378-85.
  14. Taniguchi H, Yamada T, Takeuchi S, Arai S, Fukuda K, Sakamoto S, Kawada M, Yamaguchi H, Mukae H, Yano S. Impact of MET inhibition on small-cell lung cancer cells showing aberrant activation of the hepatocyte growth factor/MET pathway. **Cancer Sci** 2017;108(7): 1378-85.
  15. Adachi Y, Watanabe K, Kita K, Kitai H, Kotani H, Sato Y, Inase N, Yano S, Ebi H. Resistance mediated by alternative receptor tyrosine kinases in FGFR1-amplified lung cancer. **Carcinogenesis** 2017; 38(11): 1063-72.
  16. Kita K, Arai S, Nishiyama A, Taniguchi H, Fukuda K, Wang R, Yamada T, Takeuchi S, Tange S, Tajima A, Nakada M, Yasumoto K, Motoo Y, Murakami T, Yano S. In vivo imaging xenograft models for the evaluation of anti-brain-tumor efficacy of targeted drugs. **Cancer Med** 2017 ; 6(12): 2972-83.
  17. Nanjo S, Ebi H, Arai S, Takeuchi T, Yamada T, Mochizuki S, Okada Y, Nakada M, Murakami T, Yano S. High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with *EGFR*-mutant lung cancer cells. **Oncotarget** 2016 7:3847-56.

〔学会発表〕(計9件)

1. European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 Congress. Yano S. Foretinib circumvents the NTRK1 G667C mutation-associated entrectinib-resistance in the brain and liver metastases produced by NTRK1 fusion-positive tumor cells. 2018年10月 Munich,

Germany

2. 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会 西山明宏, 谷本 梓, 竹内伸司, 矢野聖二. 臓器間 heterogeneity と osimertinib 耐性. 2018 年 5 月 東京
3. Fifth AACR-IASLC International Joint Conference: Lung Cancer Translational Science from the Bench to the Clinic. Yano S. Establishment of patient-derived xenograft models of lung adenocarcinoma with two different EGFR mutations, L858R and exon19 deletion. 2018 年 1 月 San Diego, USA
4. Kanazawa University Cancer Research Institute the 50th Anniversary International Symposium 2017. Yano S. Challenge to overcome targeted drug resistance. 2017 年 10 月 Kanazawa, Japan
5. 第 76 回日本癌学会学術総会 矢野聖二. SSP 基礎講座・もっと知りたい分子標的薬. 2017 年 9 月 横浜
6. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 矢野聖二. 分子標的薬の獲得耐性と耐性克服治療. 2017 年 7 月 神戸
7. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会 西山明宏, 山田忠明, 新井祥子, 谷本梓, 竹内 伸司, 矢野 聖二. NTRK1 遺伝子異常を有する大腸癌細胞株における TRK 阻害薬 Entrectinib 耐性機構の解明とその克服. 2017 年 6 月 福岡
8. The 17th World Conference on Lung Cancer (WCLC 2016). Yano S. Met copy number gain associates with gefitinib resistance in leptomeningeal carcinomatosis of EGFR mutant lung cancer. 2016 年 12 月 Vienna, Austria
9. 第 25 回日本がん転移学会学術集会総会 矢野聖二, 新井祥子, 福田康二, 山田忠明, 竹内伸司, 南條成輝, 片上信之, 岡田保典. 肺がんの髄膜がん腫症と EGFR-TKI 耐性. 2016 年 7 月 米子

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学附属病院がんセンター

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし