様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３４４１９
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０５４３３

研究課題名（和文）MET遺伝子のエクソン14欠失変異を有する肺腺癌に対する分子標的治療

研究課題名（英文）Molecular targeted therapy against adenocarcinoma of the lung harboring MET exon 14 skipping mutation

研究代表者

光冨　徹哉（MITSUDOMI, Tetsuya）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：７０２０９８０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,500,000円

研究成果の概要（和文）：肺腺癌の3%に存在するMET遺伝子のエクソン14欠失変異を有するBa/F3細胞モデルを樹立して、4種の活性型キナーゼに結合するタイプI、3種の不活性型キナーゼに結合するタイプII,1種のアロステリック阻害するMETチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の感受性を検索した。その結果capmatinibが最も有効であった。次いで、それぞれの薬剤の耐性株を取得した。タイプI耐性ではMET遺伝子のD1228とY1230、タイプII耐性はL1195と F1200に二次的変異が集中していた。一方のタイプの耐性変異は他方のタイプには感受性であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在わが国ではEGFR(50%), ALK(3%), ROS1(2%), BRAF(1%)の4種の遺伝子異常有する肺癌の分子標的治療が可能である。最近、新規のドライバーとしてMET遺伝子のエクソン14スキッピング変異が注目されているが、最適な薬剤の検討、耐性機序の解析については十分ではない。本研究ではこの変異の細胞モデルを作成し、8種のMET阻害剤の活性の比較、耐性機序の解析を行った。この結果は将来の肺癌治療の基礎データとして国民に還元し得るものである。

研究成果の概要（英文）：We established a Ba/F3 cell model with MET exon 14 skipping mutation that is present about3% of lung adenocarcinoma . Using this model, we tested its sensitivities to 8 MET-tyrosine kinase inhibitors (TKI) including 4 type I TKI that binds to the active form of the kinase, 3 type II that binds to the inactive form and one allosteric inhibitor. As a result, capmatinib was found to be most effective. Next, we derived resistant clones for each drug. D1228 and Y1230 were common sites of the secondary MET mutations for resistant cells against type I TKI, whereas L1195 and F1200 were common sites for the type II TKI. In general, the resistance mutation for type I is sensitive to type II, and vice versa.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌　分子標的治療　ドライバー癌遺伝子　チロシンキナーゼ　MET　エクソン14スキッピング

## １．研究開始当初の背景

MET 遺伝子は染色体 7q31 に位置する受容体型チロシンキナーゼであり、そのリガンドは肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)である。MET が HGF との結合や、遺伝子増幅、遺伝子変異等により活性化されると、チロシン残基がリン酸化され、そこに GAB1, GRB2, SHC 等の基質が結合することで、その下流のシグナルカスケードが活性化され、EMT（上皮間葉移行)や、細胞増殖、運動・浸潤・転移能亢進などが起こる。

MET 遺伝子増幅は胃癌、大腸癌等で、MET 遺伝子チロシンキナーゼドメインの変異は乳頭状腎癌、小児の肝細胞がんなどでまれに存在することが報告されている。肺癌においては、Ma らによって 2005 年にエクソン 14 を異常スプライシングによって欠損する MET exon14 スキッピング（MET ex14 skip）遺伝子変異が同定された。この変異については 2006 年に Kong-Beltran によって機能解析が行われた。すなわち、MET のエクソン 14(ex14) がコードする部分はユビキチンリガーゼである CBL の結合部位であるため、ex14 が欠損すると CBL が結合できず従ってプロテオソームにおけるタンパク分解を回避することでタンパク量が増し活性化されていることが示唆された。我々はこれに興味をもち、以前多数の切除肺腺癌における MET 遺伝子異常について検討した。増幅は 1.4%に認めるのみであった。しかし、3.3%(7/211)に、ex14 を異常スプライシングによって欠損する METex14 skip 遺伝子変異が存在することを報告した。しかも、この変異は EGFR や KRAS 変異と排他的であり、新規のドライバー遺伝子変異である可能性を世界に先駆けて示した。さらに、このスプライス異常はゲノムレベルで様々にスプライスコンセンサス配列を破壊する変異によることを明らかにした。(Onozato, R, Mitsudomi, T et al. J Thorac Oncol. 2016)

## ２．研究の目的

MET 変異は新たな肺腺癌の治療標的として期待された。しかしながら、単純にこの MET 変異をもつ肺癌細胞株 H596 細胞を MET チロシンキナーゼ阻害剤(MET-TKI)で処理しても細胞死は誘導されず、しばらくこの変異の意義は不明であった。我々も H596 細胞を用いて MET-TKI や siRNA による増殖抑制が見られないことを確認し、in vitro モデルを作成できないままであった。2015 になって複数のグループからこの変異を持つ患者に ALK/MET 阻害剤であるクリゾチニブを投与すると著明な腫瘍縮小効果がみられたことが報告され、やはり当初の期待は正しいことが示唆された。しかし、この変異を有する適切な細胞モデルが存在しないため、より効果的な MET-TKI の探索や、耐性機序の解明はなされていない現況であった。

そこで本研究では MET ex14 skip 変異を有するモデルを確立し、効果の修飾因子、耐性機序、併用療法の検討などの前臨床的検討をおこない、将来予測される臨床応用の基礎データを形成することを目的とした。

## ３．研究の方法

(1)MET ex14 遺伝子変異陽性細胞株の樹立

MET ex14 遺伝子変異を有するレトロウイルスを遺伝子組み替え技術で作成し、Ba/F3 細胞に導入した。Ba/F3 細胞はマウスのプロ B 細胞に由来する細胞であり、その生存・増殖にはインターロイキン 3(IL-3)が必要となる。しかし、腫瘍原生を有する遺伝子変異を導入すると、その変異遺伝子のみに依存して生存・増殖することが知られている。MET exon14 遺伝子変異を Ba/F3 細胞に導入することで、同遺伝子変異の腫瘍原生の有無の評価と合わせて、同遺伝子変異のみに依存して自律増殖する人工腫瘍細胞モデルの樹立を行った。

(2)有効な MET-TKI 感受性の探索

樹立した細胞モデルに有効性が期待される下記の 3 タイプ、合計 8 種類の MET-TKI を投与し、各薬剤の 50%阻害増殖濃度（$IC_{50}$）を算出した。

・Type Ⅰ（活性型キナーゼに結合）： crizotinib, capmatinib, tepotinib, savolitinib
・TypeⅡ(不活性型キナーゼに結合）: cabozantinib, merestinib, glesatinib
・TypeⅢ（アロステリック阻害剤）: tivantinib

(3)MET-TKI に対する耐性機序の解明

樹立細胞に、点突然変異を高率に誘発する ENU(N-ethyl-N-nitorosourea)に暴露後に、MET-TKI を投与することで薬剤結合部位に変異を起こして耐性を獲得した細胞を作成する。使用する MET-TKI は、上記(2)で有効性が確認された Type Ⅰと Type Ⅱの 7 種類を用いた。耐性獲得した細胞の MET キナーゼ領域の遺伝子配列をサンガー法にて解析した。また、各薬剤と MET キナーゼドメインとの結合モデルを用いて、得られた耐性遺伝子変異と薬剤の結合部位との関係を調べた。

(4)耐性機序に応じた克服方法の解明

二次的耐性を獲得した細胞に MET-TKI を用いて細胞増殖阻害試験を行い、耐性の変異ごとに各薬剤の感受性を評価し、交差耐性を示す薬剤、感受性が保持されている薬剤を評価した。

## ４．研究成果

### MET ex14 遺伝子変異に関する研究

1.MET-ex14 変異陽性の細胞株の樹立

MET ex14 skip 変異を有するレトロウイルスを Ba/F3 細胞に導入すると、IL3 の非存在下で細胞増殖を示すことが確認された。また、MET ex14 skip 変異の他、少数報告例のある ex14 領域の点突然変異（Y1003F, D1010Y）も同様の結果が得られた。これらの結果は、MET ex14 変異が腫瘍原生を有する可能性を示唆した。そして、同時に MET ex14 変異を有する細胞モデルの樹立に成功した。

2．有効な MET-TKI の探索

樹立した MET ex14 skip 細胞モデルに対して細胞増殖阻害試験を行い、各 MET-TKI の $IC_{50}$ を算出した（図 1）。Type Ⅰと Type Ⅱの阻害剤は概して良好な感受性を示した。臨床試験の結果で公表されているヒト薬物血中濃度を考慮すると、capmatinib が特に有望である可能性が示唆された。また、ex14 点変異(Y1003F/D1010Y)も ex14 skip 変異と同様の感受性パターンを有しており、これらも治療ターゲットとなることが示唆された。

| Origin | Mutation | Type Ia | Type Ib | | | Type II | | | Type III |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | crizotinib | capmatinib | tepotinib | savolitinib | cabozantinib | merestinib | glesatinib | tivantinib |
| Ba/F3 | Wild type + IL3 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | 408 | 842 | 715 |
| | Exon 14 skipping | 22 | 0.6 | 3.0 | 2.1 | 7.8 | 8.1 | 21 | 206 |
| | Y1003F | 19 | 0.6 | 2.4 | 2.5 | 8.6 | 6.9 | 26 | 633 |
| | D1010Y | 20 | 0.4 | 1.3 | 2.0 | 7.5 | 6.4 | 18 | 609 |
| | TPR-MET | 68 | 2.2 | 24 | 8.8 | 86 | 28 | 189 | 736 |
| Human gastric cancer | Hs746t (Exon 14 skipping) | 47 | 1.6 | 2.2 | 119 | 46 | 191 | 331 | 92 |
| $C_{max}$ (nM) | | 1123 | 9068 | 2621 | 10150 | 2810 | 539 | 906 | 7465 |
| $C_{trough}$ (nM) | | 540 | N/A | N/A | 135 | N/A | N/A | N/A | N/A |

$IC_{50} \leqq 50nM$

$50 < IC_{50} < 200nM$

$IC_{50} \geqq 200nM$

N/A : Not Available

図1. MET-TKI の $IC_{50}$

3.MET-TKI に対する耐性機序の解明

上記で有効性が確認され、また第2相臨床試験が進行中である7種の MET-TKI の二次的耐性機序を ENU 法で解析した。二次的変異は12箇所のアミノ酸残基に認められ、置換アミノ酸の種類を含めると合計26種類であった(図3)。活性型キナーゼに作用するタイプIは D1228 と Y1230、不活性型に作用するタイプ II は L1195 と F1200 に変異を多く認め、タイプ別に二次的変異が出現する共通部位があることを見出した(図2)。

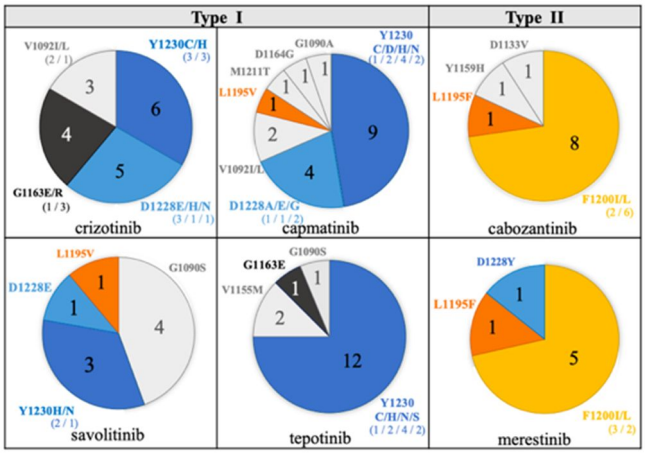


図2.各 MET-TKI における耐性変異の種類

4. MET-TKI の耐性の克服

得られた26種類の耐性株を用いて、再び MET-TKI の感受性を評価し、各耐性に対して感受性を保持している薬剤の有無を評価した。タイプIに対して共通して出現する D1228 と Y1230 残基の二次的変異には、いずれのタイプI阻害剤にも高度耐性を示したが、タイプ II 阻害剤には感受性を保持していた。一方、タイプ II に共通する L1195 と F1200 アミノ酸残基の二次的変異は、いずれのタイプ II にも高度耐性を示したが、タイプ I 阻害剤に対しては感受性が保持されていた。これらの結果は、図4で示されるように各タイプの薬剤で共通する二次的変異が、もう一方のタイプの薬剤の結合部位に影響を与えないために相互補完的な関係を有する可能性が推測された。

今回得られた結果より MET-TKI による耐性二次的変異に対しては、異なるタイプの MET-TKI を使い分けることで耐性克服が期待できる可能性が示唆された。

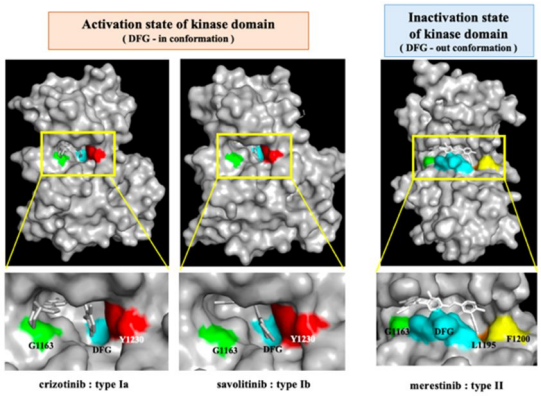


図3. 各 MET-TKI の結合様式の比較

MET 遺伝子の他に、肺癌のドライバー遺伝子である HER2 や EGFR 遺伝子変異に関する研究も行った。

**肺癌でみられる HER2 変異を導入した細胞の感受性の比較**

1.肺癌のドライバー遺伝子の一つである HER2 遺伝子変異の頻度について文献検索を行い、A775_G776insYVMA (YVMA), G776delinsVC (VC) and P780_Y781insGSP (GSP)の3つの変異の頻度が高いことを明らかにした。これら遺伝子変異を導入した HER2 遺伝子変異細胞に対して、9種類の HER2-TKI(erlotinib, afatinib, dacomitinib, neratinib, osimertinib, AZ5104, poziotinib, pyrotinib,

lapatinib，irbinitinib)を投与し、各遺伝子変異に対する感受性を90%阻害濃度(IC90)を用いて比較した結果、新規HER2-TKIの一つであるpoziotinibがこれら3つの変異細胞に対して特に高い有効性を示すことを明らかにした(図4)。

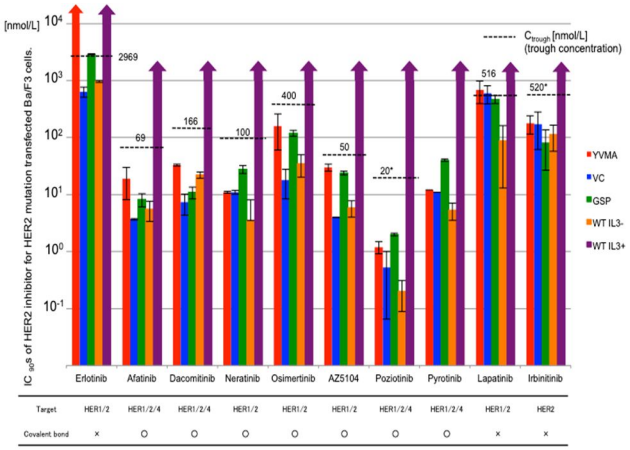


図4．各変異に対する各薬剤の効果比較

2．poziotinibに対する耐性機序の発見

各HER変異を導入した細胞に対して、ENU存在下にpoziotinibを暴露し、耐性機序の検索を行った。その結果、YVMAとVC変異の細胞における耐性二次変異としてC805Sを同定した(図5)。耐性二次変異C805Sを獲得した細胞は、獲得前の細胞と比較して、poziotinibに対するIC90値が約100倍高値であった。

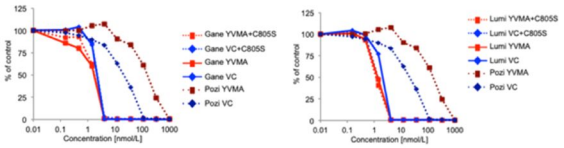


図5.Poziotinibに対する獲得二次耐性

3.Poziotinibに対する耐性機序の克服

poziotinibに対する耐性二次変異であるC805Sを克服するため、C805Sを獲得したpoziotinib耐性細胞に対して、各種薬剤をテストした。その結果、HSP90阻害剤であるganetespibとluminespibが有効性を示した(図6)。

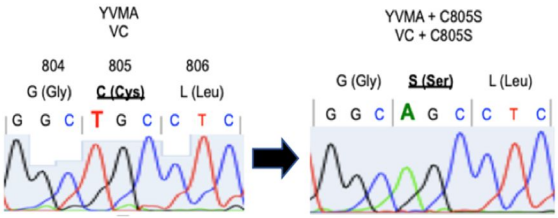


図6．HSP90阻害剤による耐性変異の克服

**一次治療における第3世代EGFR-TKIであるosimertinibの耐性化二次変異の予測**

1.　EGFR遺伝子変異陽性の肺癌に対して、従来osimertinibは第一世代や第二世代EGFR-TKIに対してT790M二次変異によって耐性化した症例に使用されてきた。しかし、2018年から本邦においても一次治療でのosimertinibの使用が推奨されるようになった。一方で、第一世代や第二世代に対するT790M二次変異のように、一次治療osimertinibに対する耐性二次変異に関して明らかではない。

2. 文献検索により、T790M陽性例に対してosimertinibを使用された場合の耐性化三次遺伝子変異を検索した。L718Q/V、G724S，L792F/H，G796S，C797G/Sを同定した。これらを活性型遺伝子変異であるExon 19欠失変異とL858Rと組み合わせてBa/F3細胞に遺伝子導入し、各種TKI(erlotinib，afatinib，dacomitinib，osimertinib，brigatinib)を投与し、各遺伝子変異の感受性を50%阻害濃度($IC_{50}$)で評価し、一次治療での耐性獲得後の至適薬剤を検討した。

3. 各変異遺伝子を有するレトロウイルスを作成してBa/F3細胞に導入した。導入した遺伝子の腫瘍原生を評価すると共に、上記薬剤で細胞増殖阻害試験を行い、$IC_{50}$を算出し、比較した。(図7)

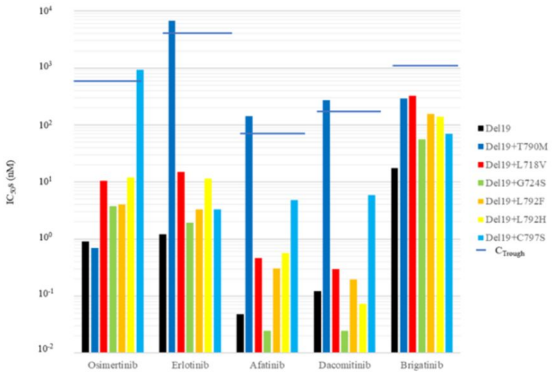


図7.各耐性株における各薬剤の $IC_{50}$ の比較

4. Exon 19 欠失変異では C797S のみが osimertinib に対して強い耐性を示したが、それ以外はいずれも弱い耐性を示す程度であった。それに対して L858R 変異では、C797S だけではなく C797G や L718Q/V でも強い耐性を示した。さらに L792F/H でも中等度の耐性を示した。さらに、Exon 19 欠失変異に対しては C797S を含めたすべての耐性化二次変異で erlotinib が有効であったのに対して、L858R では C797S に対しては erlotinib が有効であったが、それ以外に対しては afatinib と dacomitinib が有効であった（図8）。

| | Del 19 | | | | | | L858R | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Del19+L718V | Del19+G724S | Del19+T790M | Del19+L792F | Del19+L792H | Del19+C797S | L858R+L718Q | L858R+L718V | L858R+T790M | L858R+L792F | L858R+L792H | L858R+C797G | L858R+C797S |
| Erlotinib | | | | | | | | | | | | | |
| Afatinib | | | | | | | | | | | | | |
| Dacomitinib | | | | | | | | | | | | | |
| Brigatinib | | | | | | | | | | | | | |

| | Erlotinib | Afatinib/Dacomitinib | Osimertinib | Brigatinib |
|---|---|---|---|---|
| Sensitive | $IC_{50} \leqq 20nM$ | $IC_{50} \leqq 4.5nM$ | $IC_{50} \leqq 10nM$ | $IC_{50} \leqq 20nM$ |
| Intermediate | $20nM < IC_{50} \leqq 100nM$ | $4.5nM < IC_{50} \leqq 10nM$ | $10nM < IC_{50} \leqq 50nM$ | $20nM < IC_{50} \leqq 100nM$ |
| Resistant | $100nM < IC_{50}$ | $10nM < IC_{50}$ | $50nM < IC_{50}$ | $100nM < IC_{50}$ |

図8. 感受性一覧

5．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）


① Koga T, Kobayashi Y, Tomizawa K, Suda K, Kosaka T, Sesumi Y, Fujino T, Nishino M, Ohara S, Chiba M, Shimoji M, Takemoto T, Suzuki M, Jänne PA, **Mitsudomi T**. Activity of a novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: An in vitro study. Lung Cancer、査読有、Vol.126、2018、pp. 72-79. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.10.019.

② Nishino M, Suda K, Kobayashi Y, Ohara S, Fujino T, Koga T, Chiba M, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, **Mitsudomi T.** Effects of secondary EGFR mutations on resistance against upfront osimertinib in cells with EGFR-activating mutations in vitro. Lung Cancer、査読有、Vol .126、pp. 149-155. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.10.026


〔学会発表〕（計 2 件）


① Koga T, Kobayashi Y, Tomizawa K, Kosaka T, Sesumi Y, Fujino T, Nishino M, Ohara S, Chiba M, Shimoji M, Suda K, Takemoto T, P. A. Jänne and **Mitsudomi T**. Activity of novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance. 19th World Conference on Lung Cancer, Toronto, Canada, 2018.

② Fujino T , Suda K, Kobayashi Y, Koga T, Nishino M, Tomizawa K, Sesumi Y, Ohara S, Chiba M, Shimoji M, Suda K, Takemoto T, and **Mitsudomi T**. In Vitro Evaluation for Optimal MET-TKI Selection in Lung Cancers with MET Mutations Including Exon 14 Skipping. 19th World Conference on Lung Cancer, Toronto, Canada, 2018.


〔図書〕（計 0 件）
〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
https://www.kindai.ac.jp/medicine/research/teachers/introduce/tetsuya-mitsudomi-114.html

６．研究組織

（1）研究分担者

研究分担者氏名：西尾　和人
ローマ字氏名：(NISHIO, Kazuto)
研究機関名：近畿大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(８桁)：10208134

研究分担者氏名：冨田　秀太
ローマ字氏名：(TOMIDA, Shuta)
研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：准教授
研究者番号(８桁)：10372111

（3)研究協力者

研究協力者氏名：須田　健一
ローマ字氏名：(SUDA, Kenichi)

研究協力者氏名：小林　祥久
ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Yoshihisa)

研究協力者氏名：古賀　教将
ローマ字氏名：(KOGA, Takamasa)

研究協力者氏名：藤野　智大
ローマ字氏名：(FUJINO, Toshio)

研究協力者氏名：西野　将矢
ローマ字氏名：(NISHINO, Masaya)