

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08141

研究課題名（和文）PDXモデルを使用したEGFR陽性肺腺がんに対するオシメルチニブ耐性機構の研究

研究課題名（英文）Study of osimertinib resistance mechanism against EGFR-positive lung adenocarcinoma using PDX model

研究代表者

北 賢二（Kita, Kenji）

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助手

研究者番号：80625252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺腺がんと診断された3例で、PDXモデルを確立した。手術時の検体（surgically resected tumors：SRT）とPDXモデルで生着した腫瘍において、H&E染色、免疫染色により比較し、組織型（分化度、間質量）が維持されていることを確認した。#11の症例ではオシメルチニブによる治療が著効し、腫瘍が消失したため、耐性を誘導できなかった。一方、#7の症例では、約100日でオシメルチニブ耐性化に成功し、オシメルチニブ耐性PDXモデルを確立した。以上の結果から、当初の目的であるPDXモデルの系を確立でき、PDXモデルによるEGFR阻害薬の治療効果判定に応用することを達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前臨床モデルであるヒトがん細胞株を用いた研究においては、患者の腫瘍が本来有している腫瘍組織微小環境や腫瘍不均一性が欠如しており、実臨床との薬剤感受性の乖離がしばしば問題となる。しかし、本研究で作製に成功したPDXモデルでは患者組織を反映しており、治療薬のスクリーニング、薬剤耐性研究に活用できる。さらに、PDXモデルを利用し解析することにより、肺がんの再発あるいはEGFR阻害薬耐性となった患者に新たな治療薬を提案でき、肺がん患者の予後改善につながることを期待され、本研究成果は社会的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：A PDX model was established in 3 patients diagnosed with lung adenocarcinoma. We compared the tumors engrafted with surgically resected tumors (SRT) and PDX models by H & E staining and immunostaining, and confirmed that the histological type (degree of differentiation, interstitial mass) was maintained. In case # 11, treatment with osimertinib was so successful that we were unable to induce resistance because the tumor disappeared. On the other hand, in case # 7, we succeeded in making osimertinib resistant in about 100 days and established a PDX model of osimertinib resistance. From the above results, it was possible to establish the PDX model system, which was the original purpose, and to apply the PDX model to the therapeutic effect determination of EGFR inhibitors.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：PDX 肺がん EGFR変異 Osimertinib オシメルチニブ耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肺がん死亡者数は国内にかぎっても 8 万人に達しようとしており、がん種別では最も多い。手術不適応の多い肺がんでは依然予後が悪く、患者の肺がんの個性に適した医薬の選択、薬剤耐性機序の診断、耐性機序に即した治療薬選択が重要となる。

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 変異は日本人肺がんの 25~30%程度にあり、最も頻度の高い遺伝子異常である。薬剤感受性 EGFR 変異として exon 19 の欠失、exon 21 L858R があり、この 2 つの変異が EGFR 陽性肺腺がんの約 90%を占める。現在、EGFR 阻害薬 (EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor : EGFR-TKI) は、第 1 世代のゲフィチニブ、エルロチニブ、第 2 世代のアファチニブ、第 3 世代のオシメルチニブが国内で承認されている。また、第 2 世代以降では、EGFR-TKI 耐性 2 次変異である T790M 変異に対しても阻害活性を持つ。しかしながら、EGFR-TKI は一旦奏効するものの、9 か月~1 年でほぼ例外なく耐性獲得に至る。また、薬剤感受性変異があるにもかかわらず、初期治療に耐性を来す症例も問題となっている。患者の肺がんの特性が反映された非臨床モデルでの診断・治療の検証が突破口となると期待されている。

Patient Derived Xenograft (PDX)

従来 of 細胞株を用いた in vivo 実験では、細胞の均一性により、実臨床を反映していない。これに対し、肺がん患者由来の腫瘍組織を重度複合免疫不全マウス (SCID Hairless Outbred マウス : SHO マウス ; リンパ T、B 細胞欠失) 及び超免疫不全マウス (NOG マウス : リンパ T、B 細胞、NK 細胞及び補体活性欠失、樹状細胞及びマクロファージ機能低下) 皮下に移植するモデル (Patient-Derived Xenograft: PDX) は、ヒト肺がん患者の腫瘍特性とがん微小環境特性が維持されたモデルであり、より正確な薬剤感受性の予測・評価が可能であるとともに、薬剤耐性機構の解明、耐性モデルでの医薬候補の検証が可能と考えられる。

2. 研究の目的

前臨床モデルであるヒトがん細胞株を用いた研究においては、患者の腫瘍が本来有している腫瘍組織微小環境や腫瘍不均一性が欠如しており、実臨床との薬剤感受性の乖離がしばしば問題となる。そこで本研究では、患者の新鮮手術検体を用い、ヒト EGFR 変異陽性肺腺がんの患者組織移植モデル Patient derived xenograft (PDX) の系を確立し、EGFR 阻害薬の治療効果判定に応用することを目的としている。PDX が確立した系では、腫瘍を凍結保存することにより治療薬のスクリーニング、薬剤耐性の研究に活用できる。この PDX モデルを利用し解析することにより、再発あるいは EGFR 阻害薬耐性となった患者に新たな治療薬を提案でき、肺がん患者の予後改善につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) EGFR 変異陽性肺腺がん検体の SHO マウス、NOG マウスへの生着の検討

EGFR 変異陽性肺腺がん検体は金沢大学附属病院呼吸器外科より供与されたものを使用するが、摘出された手術検体の内、病理診断に支障のない部位を用いる。移植用マウスは SHO マウス及び NOG マウスを使用する。マウスに生着した腫瘍が 1000mm³(長径×短径×短径/2) 程度に達した際、腫瘍を 2~5mm 片にカットする。その際、一部を DNA、RNA、タンパク質採取用に凍結保存、免疫染色用にホルマリン固定を行った。残りの腫瘍を別の SHO、NOG マウス 2 匹に移植し、生着を試みた。その後、生着し増大した腫瘍を同様に凍結保存、ホルマ

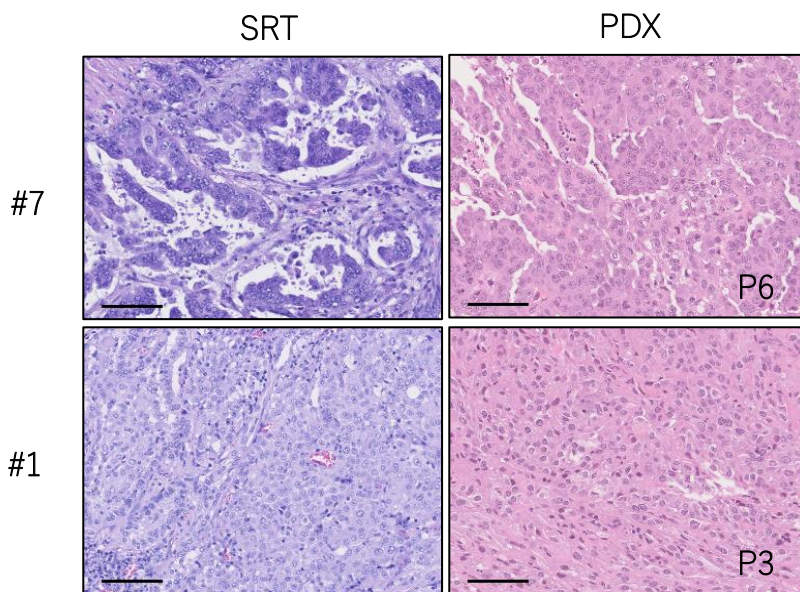
リン固定し、さらに **SHO**、**NOG** マウスに移植した。少なくとも 2 回以上継代できた場合に **PDX モデル**の系を確立できたと定義する。

(2) EGFR 阻害薬の治療効果

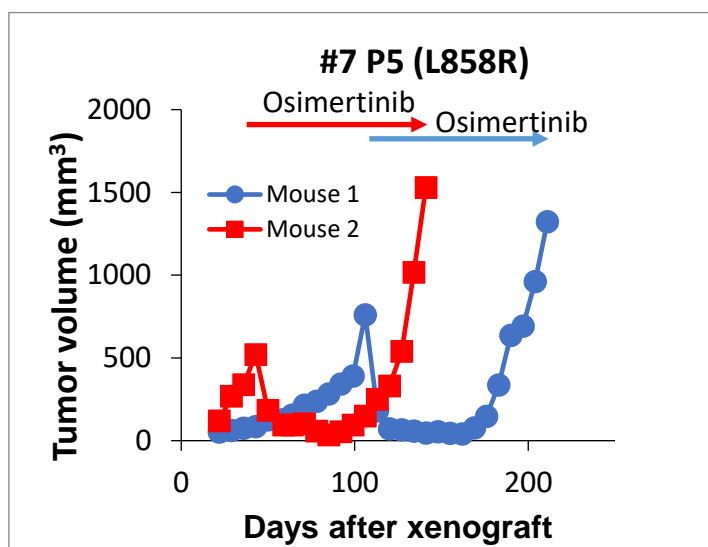
PDX モデルを確立できた 3 例の内 2 例 (#7、#11) では EGFR 変異 (L858R、exon 19 deletion) が検出された。確立した EGFR 変異肺がん **PDX** 2 例でオシメルチニブによる治療効果を検討した。

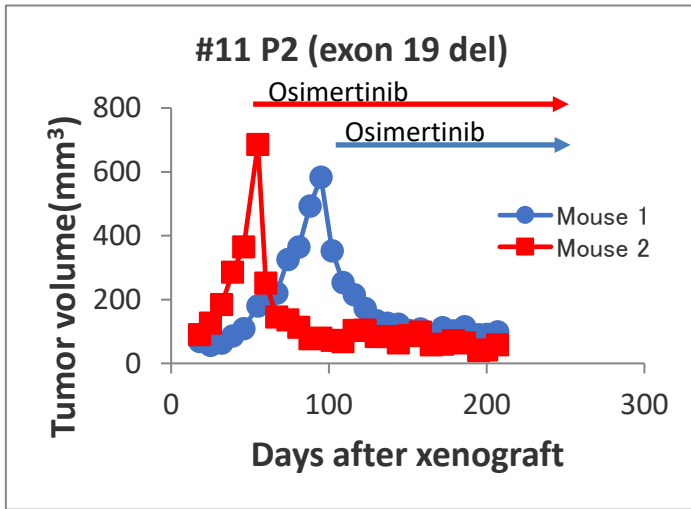
4. 研究成果

(1) 肺腺がんと診断された 3 例で、2 継代以上継続し、**PDX モデル**を確立した。手術時の検体 (surgically resected tumors : SRT) と **PDX モデル**で生着した腫瘍において、H&E 染色、免疫染色により比較し、組織型 (分化度、間質量) が維持されていることを確認した。



(2) #11 の症例ではオシメルチニブによる治療が著効し、腫瘍が消失したため、耐性を誘導できなかった。一方、#7 の症例では、約 100 日でオシメルチニブ耐性化に成功し、オシメルチニブ耐性 **PDX モデル**を確立した。





以上の結果から、オシメルチニブ耐性の原因特定には至らなかったが、当初の目的である **PDXモデルの系**を確立でき、その**PDXモデル**をEGFR阻害薬の治療効果判定に応用することが達成できた。今後はオシメルチニブ耐性の原因を特定するためにさらに検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Kita, Koji Fukuda, Hiro Takahashi, Azusa Tanimoto, Akihiro Nishiyama, Sachiko Arai, Shinji Takeuchi, Kaname Yamashita, Koshiro Ohtsubo, Sakiko Otani, Naohiro Yanagimura, Chiaki Suzuki, Hiroko Ikeda, Masaya Tamura, Isao Matsumoto, Seiji Yano	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 Patient derived xenograft models of non small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3215-3224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, Terashima M, Ishimura A, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yamashita K, Yamano T, Yoshimura A, Takayama K, Kaira K, Taniguchi Y, Atagi S, Uehara H, Hanayama R, Matsumoto I, Han X, Matsumoto K, Wang W, Suzuki T, Yano S.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18442-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	矢野 聖二 (Yano Seiji) (30294672)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------