

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15296

研究課題名(和文) 遺伝子変異を有する非小細胞肺がんのPDXモデル樹立と新薬開発の基盤研究

研究課題名(英文) Establishment of PDX model for non-small cell lung cancer with genetic alteration and basic research for new drug development

研究代表者

柳下 薫寛 (Yagishita, Shigehiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80781674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：総計245検体の肺がん検体から、小細胞肺がん4株(生着率38%)、非小細胞肺がん65株(生着率21%)のPDXを作成した。うち臨床検査で遺伝子異常をもつPDXの内訳と生着率はEGFR 7株(16%)、ALK 5株(21%)、ROS1 1株(33%)、MET skipping 0株(0%)、RET 1株(25%)、HER2遺伝子増幅1株(100%)であった。5株の遺伝子異常陽性PDXを用い元患者との臨床効果の対比を行なったところ、一部の株では一致、一部の株では不一致との結果であった。未承認薬においても薬効の違いが確認され、有用な評価基盤である一方、投与量の最適化が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開発において構築された基盤は、遺伝子異常を有する非小細胞肺がんにおける薬効評価基盤として活用可能であることが示唆された。また、薬剤耐性期のPDXは耐性後の治療戦略の構築や創薬開発研究に有用であることが期待される。一方で、PDXを用いた臨床効果予測に関しては、評価方法の最適化が必要と考えられ、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：From a total of 245 lung cancer specimens, we successfully generated PDXs for 4 small cell lung cancer (engraftment rate: 38%) and 65 non-small cell lung cancer (engraftment rate: 21%) PDXs. The number of PDXs and its engraftment rate with clinical gene abnormalities were 7 EGFR (16%), 5 ALK (21%), 1 ROS1 (33%), 0 MET skipping (0%), 1 RET (25%), and 1 HER2 gene amplification (100%). We compared the clinical efficacy of the five genetically aberrant PDXs with that of the original patients, and found that some strains were concordant and some were discordant. The differences in efficacy were confirmed even in unapproved drugs, and while this is a useful basis for evaluation, the dosage needs to be optimized.

研究分野：TR研究

キーワード：PDX 遺伝子異常 非小細胞肺がん 臨床効果予測 分子表的治療薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺がんは本邦における部位別がん死亡数の第1位を占め、初診時には半数以上の患者が根治的な治療を行えず、抗がん剤による生存期間の延長を図るしかない。近年分子標的治療薬の開発、上市により肺がんの生存期間は延長しており、特に EGFR 遺伝子変異陽性、ALK 融合遺伝子陽性の肺腺がんはそれぞれに対する分子標的治療薬の使用により多大なる恩恵を受けられることがわかっている。しかし全ての抗がん剤で薬剤耐性は不可避であり、耐性克服と新薬開発は急務となっている。このため、EGFR 陽性、ALK 陽性の未治療例、耐性例における PDX モデルを樹立し、新規創薬の基盤を整備することは他の組織型や遺伝子異常への応用も可能であり、重要な課題であると考えられる。

抗がん剤の開発は非臨床試験、臨床試験と進み第一相臨床試験から上市に至る薬剤は全体の5%程度と報告されている (Nat Rev Drug Discov, 2009)。この抗がん剤開発の難しさはがん治療における最も重要な課題であり、なぜ抗がん剤開発が進まないのか? という問いが本研究課題の核心である。現在の抗がん剤開発のボトルネックは「薬剤が有効である対象疾患と有効性の証拠を得る難しさ(POC 取得の難しさ)」であり、前臨床段階でのより効率的な薬剤スクリーニングと POC 取得が火急の課題である。

過去数十年にわたり前臨床の薬剤スクリーニングはヒト由来の培養細胞株及びその移植マウスモデルを元に行われてきたが、臨床効果の予測性は必ずしも高くない。このため 2016 年に米国国立がん研究所 (NCI) は薬剤スクリーニングを細胞株から、患者の腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植する PDX モデルへと置き換えることを公表した。さらに大腸がん、非小細胞肺がんにおいて臨床試験の奏効率と PDX モデルでの奏効率が 80%の一致率と非常に高いことが報告され、PDX モデルの創薬利用は今後急速に進むことが予測される (Nat Rev Cancer, 2017)。すでに NCI は米国内で PDX モデルの配布を開始し、欧州では EurOPDX コンソーシアムが稼働を始めている。しかし本邦では未だ PDX モデルの樹立、運用は始まっておらず早急な体制整備が望まれる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、EGFR, ALK 陽性肺腺がん患者由来の PDX モデルを樹立し、既存の薬剤及び新規薬剤の薬効を確認することを目的とした。これが達成されることにより、

前臨床段階で高い精度での薬剤の POC が取得できる

薬剤投与前後の腫瘍組織評価を行うことで薬剤分布や標的遺伝子、蛋白の評価が可能

PDX モデルで耐性機序やバイオマーカーの選定、臨床応用を検討できる

腫瘍内の不均一性や生物学的特性を維持した状態で腫瘍の培養、経時的評価が可能

などの成果を得ることができる。この成果は薬剤開発の促進、そして将来的には肺がん患者の診断と同時に PDX モデルを作成し患者ごとに個別化医療を行うなど、肺がんの予後改善に役立つと期待される。

3. 研究の方法

本研究では上記の目標を達成するために以下のマイルストーンを設定した。

PDX モデルの樹立手法の決定

PDX モデルの臨床的妥当性と臨床予測性の証明

PDX モデルを用いた新規薬剤のスクリーニング

以降は、各目標に向けた具体的な実施内容である。

PDX モデルの樹立手法の決定

PDX の樹立手法はまだ定まったものがなく、患者腫瘍検体の種類(手術検体、生検検体、血液由来腫瘍検体)、検体採取からの取り扱い(適切な培地、保存方法)、必要な腫瘍量、マウスへの移植方法(検体をそのまま移植、細胞を単離して移植)、腫瘍検体の移植部位(皮下、同所移植)など多くの検討課題がある。国立がん研究センター研究所分子薬理分野では、すでに希少がんや乳がんなどで PDX モデルの樹立に着手、成功しており同センター内で成功した手法を元に、肺がん PDX における最適な手法を検討する。

具体的には、1cm 角の新鮮な腫瘍検体を保存培地で 4 保管し、1~2mm 角の腫瘍組織 3-4 個をそれぞれ超免疫不全マウス(NOG マウス)へ皮下移植する。腫瘍の生着が確認できた場合には組織を採取、一部を継代し次の NOG マウスへ移植、病理組織検査や遺伝子検査のための組織も保存する。将来的には同所移植(肺移植)も検討するが、肺移植の場合生着やサイズの確認が困難であるため、まずは皮下移植での成功を確認した上で同所移植を検討する。

既存の報告では PDX の樹立可能性は 20~50%と幅があり、当初は手術検体を中心に国立がん研究センター中央病院並びに順天堂大学呼吸器内科などからの腫瘍検体の提供を受け、初年度で年間 10~20 株(EGFR 陽性未治療例 6 株、耐性例 2 株、ALK 陽性未治療例 3 株、耐性例 2 株)の樹立を目指す。研究期間の 3 年間で計 50~100 株(EGFR 陽性未治療例 30 株、耐性例 10 株、ALK 陽

性未治療例 20 株、耐性例 10 株)の樹立を目指す。

PDX モデルの臨床的妥当性と臨床予測性の証明

PDX モデルでの課題としては、ヒトとマウスにおける免疫状態の違い、腫瘍の進展形式が異なる可能性、継代により腫瘍の性質が変化する可能性などが考えられる。このため、PDX モデルの臨床的妥当性を検証するために、元々の腫瘍検体と各継代時点での PDX 腫瘍検体の遺伝子発現プロファイル、病理学的形態変化を確認する。同時に継代による腫瘍の増殖スピードや転移形式の変化も確認する。

PDX モデルの臨床予測性としては、EGFR 陽性株においては gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib などの実臨床で用いられている EGFR チロシンキナーゼ阻害剤、ALK 陽性株においては crizotinib, alectinib, ceritinib などの ALK 阻害剤を用いて薬効を確認し、既存の臨床試験における効果との相違がないかを確認する。また、薬剤への長期暴露による耐性誘導に関しても検討を行う。

PDX モデルを用いた新規薬剤のスクリーニング

肺がんは現在腺がんが全体の 50%以上を占める。腺がんでは EGFR、ALK、ROS1、RET、BRAF などの標的となりうる遺伝子異常が発見され、対応する分子標的薬剤が大きな治療効果を上げている。しかし依然腺がんの 30%程度では遺伝子異常が認められず、扁平上皮がんや小細胞肺がんでは全く分子標的治療薬の有効性が認められていない。近年、抗 PD-1 抗体に代表される免疫チェックポイント阻害剤が開発され重要な治療戦略の一つとなっているが、効果が認められるのは一部の患者集団のみであり、がんを根治できる夢の治療ではない。さらに近年の臨床試験、試験はこれらの分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の組み合わせにより多様化し、混沌としている。前臨床試験で高い精度で POC を取得し臨床試験へ移行することが今後より重要となってくると考えられる。

本研究で樹立した EGFR 陽性、ALK 陽性 PDX モデルを用い各種新規薬剤の薬効確認や既存薬再開発(Drug-repositioning)を行い、薬効が得られる腫瘍のプロファイルの確認と POC を確立した上で臨床試験へと結びつける。また、本研究で得られた知見を元に他の遺伝子異常を有する肺腺がんや、有効な分子標的治療薬のない肺腺がん、扁平上皮がん、小細胞肺がんにおいても PDX モデルの樹立、新規薬剤のスクリーニングを行う基盤整備を目指す。

4. 研究成果

PDX モデルの樹立手法の決定

研究期間内に総計 245 にも及ぶ肺がん臨床検体を取得した。うち小細胞肺がん 21 検体、非小細胞肺がん 224 検体であった。一部液状検体では肺内投与や、血液から CTC の分離の上移植を試みたが生着が得られず、以後全ての検体は背部皮下移植とした。生着率は小細胞肺がんが 38%、非小細胞肺がんが 21%と、小細胞肺がんが生着率が高い傾向を認めた。

非小細胞肺がん 224 検体中、臨床検査において何らかのドライバー遺伝子異常をもつ検体は 76 検体であり、遺伝子変異の内訳と生着率は EGFR 遺伝子変異 43 検体 (16%)、ALK 融合遺伝子 24 検体 (21%)、ROS1 融合遺伝子 3 検体 (33%)、MET skipping 1 検体 (0%)、RET 融合遺伝子 4 検体 (25%)、HER2 遺伝子増幅 1 検体 (100%)であった。

治療歴と生着率の関連では、全般的に化学療法歴を有する患者検体では未治療例に比べ生着率が高い傾向を認め、特に EGFR 遺伝子変異陽性例では未治療例の検体 7 検体中生着はなく、既治療例の検体 36 検体中 7 検体 (19%)で生着が得られた。既報でも EGFR 遺伝子変異陽性未治療例では生着率が低いことが報告されており、化学療法後に腫瘍の悪性度や増殖能が上昇することで PDX 生着が得られやすくなる可能性が示唆された。

PDX モデルの臨床的妥当性と臨床予測性の証明

PDX の臨床的妥当性を確認するため、EGFR、ALK、ROS1、HER2 遺伝子増幅を有する PDX 5 株に着目し、解析を実施した。病理学的評価では元腫瘍と組織構造が保持されていることを確認し、遺伝子解析ではドライバー遺伝子が境内を経ても維持されることを確認した。

これらの PDX において、元の患者で投与されたチロシンキナーゼ阻害剤を PDX で投与実験を行った。この結果、一部の PDX では患者の治療効果と一致した一方、一部の PDX では一致しなかった。この原因を探索するため薬物血中濃度、腫瘍内濃度測定を実施した。しかしいずれの濃度も最終投与後 24 時間の時点で採取しており、非常に低値であり、評価不能であった。薬剤投与量により治療効果の齟齬が生まれている可能性もあり、一方で PDX における臨床効果対比を目的とした薬剤投与量は最適化されておらず、詳細な血中および腫瘍内薬物濃度の経時的評価と、投与量の最適化が必要と考えられた。

PDX モデルを用いた新規薬剤のスクリーニング

上記 5PDX モデルに対し、患者において投与されていない未承認薬の投与実験を実施した。この結果、ALK や ROS1 においては著明な薬効を確認した。しかし HER2 遺伝子増幅に対して pan-HER 阻害剤である afatinib は薬効を示さず、一方で poziotinib は薬効が確認されており、pan-HER 阻害薬によって効果が異なることが確認された。

以上の結果は原著論文として取りまとめ、論文投稿中である。

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 0件）

1. 著者名 Yagishita Shigehiro, Kato Ken, Takahashi Mami, Imai Toshio, Yatabe Yasushi, Kuwata Takeshi, Suzuki Mikiko, Ochiai Atsushi, Ohtsu Atsushi, Shimada Kazuaki, Nishida Toshiro, Hamada Akinobu, Mano Hiroyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Characterization of the large scale Japanese patient derived xenograft (J PDX) library	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2454 ~ 2466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Mikiko, Yagishita Shigehiro, Sugihara Kiyoshi, Ogitani Yusuke, Nishikawa Tadaaki, Ohuchi Mayu, Teishikata Takashi, Jikoh Takahiro, Yatabe Yasushi, Yonemori Kan, Tamura Kenji, Hasegawa Kosei, Hamada Akinobu	4. 巻 AOP
2. 論文標題 Visualization of Intratumor Pharmacokinetics of [fam-] Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a) in HER2 Heterogeneous Model Using Phosphor-integrated Dots Imaging Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 AOP
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-21-0397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳下薫寛
2. 発表標題 患者腫瘍移植モデル樹立過程における移植片対宿主病の発生頻度
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白澤昌之、柳下薫寛
2. 発表標題 肺癌患者の背景によるPDX生着率:J-PDXライブラリープロジェクトの肺癌コホート
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------