

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18216

研究課題名（和文）MET異常肺癌に対する新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapeutic strategy for MET-dependent lung cancer

研究代表者

諏澤 憲（suzawa, ken）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90839713

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）：本研究はMET肺がんの分子標的治療に対する耐性機序の解明およびその克服を目的とした。MET遺伝子増幅を有する肺癌細胞株H1993とEBC1のクリゾチニブ（MET阻害薬）耐性株を樹立し、以下の3種類の耐性機序を明らかにした。MET遺伝子増幅の消失、さらにEGFR遺伝子の変異および増幅による耐性獲得。EGFR阻害薬アファチニブの併用による増殖抑制効果あり。SERPINE1発現上昇による耐性獲得。SERPINE1阻害剤併用による耐性克服を確認。上皮間葉移行（EMT）およびMEK/MAPK経路活性による耐性獲得。MEK阻害剤トラメチニブ併用により増殖抑制効果あり。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的治療の確立には、遺伝子プロファイルに基づき、いかに治療が奏功する集団を抽出できるかが鍵となる。また分子標的薬は、治療当初は著効するが、ほぼ全例で最終的に耐性化を来すといった治療獲得耐性も重要な問題となる。MET標的療法でも数多くの耐性に関与する機序が存在することが予想されるが、現時点では未だ十分な知見は得られていない。本研究では、MET標的に対する複数の新規耐性機序が示された。この知見は肺がん治療成績の向上につながるものであり、社会的にも意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the mechanism of resistance to MET-targeted therapy in MET-aberrant lung cancer and to overcome it. Crizotinib (MET inhibitor) resistant clones of lung cancer cell lines, H1993 and EBC1, which harbor MET amplification, were established, and the following three resistance mechanisms were clarified. (1) Acquisition of resistance via loss of MET gene amplification, and acquisition of mutation and amplification of EGFR gene. For this clone, the combined therapy of crizotinib and the EGFR inhibitor, afatinib, showed significant inhibitory effect on cell growth. (2) Acquisition of resistance by increasing the expression of the SERPINE1 gene. It was confirmed that this resistance was overcome by the combined use of SERPINE1 inhibitor. (3) Acquisition of resistance by epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activation of MEK / MAPK pathway. An inhibitory effect on cell growth was observed by the combined use of the MEK inhibitor, trametinib.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：MET肺がん 薬剤耐性 分子標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MET 遺伝子異常 (増幅、エクソン 14 欠失変異(METex14)) は、がんの発生・進展に深く関わるドライバー変異であるが、MET 増幅と METex14 はそれぞれ肺腺がんの約 1%と 3-4%に存在すると言われ、特に METex14 は新たな治療標的として注目されている。分子標的治療の確立には、遺伝子プロファイルに基づき、いかに治療が奏功する集団を抽出できるかが鍵となる。分子標的薬は、治療当初は著効するが、ほぼ全例で最終的に耐性化を来すといった治療獲得耐性も重要な問題となる。EGFR 変異肺がんの経験より、MET 標的療法でも数多くの耐性に関する機序が存在することが予想されるが、現時点では未だ十分な知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究は、MET 異常肺がんに対する個別化治療を確立することを目的とする。具体的には、MET 標的治療の過程で必ず問題となる獲得耐性について、多彩な耐性に関する機序を明らかにし、その耐性機序スペクトル別に最適な耐性克服の治療戦略を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

MET 標的療法に対する薬剤耐性株の樹立

MET シグナルに増殖・生存を依存する MET 遺伝子増幅肺癌細胞株 (H1993 および EBC1) をクリゾチニブ (MET 阻害薬) へ長期暴露させることにより、薬剤耐性株を樹立する。

オミックス解析による耐性機序の探索および検証実験

樹立した耐性細胞株を、蛋白リン酸化キナーゼアレイ解析、次世代シーケンサーを用いたがん関連遺伝子変異および発現プロファイル解析などの網羅的オミックスを実施し、耐性候補の探索を行う。

治療耐性を克服する治療法の探索

耐性克服に向けた治療の検討を行う。

4. 研究成果

MET 標的療法に対する薬剤耐性株の樹立

2 種類の MET 遺伝子増幅肺癌細胞株 (H1993 および EBC1) をクリゾチニブ (MET 阻害薬) へ 2 つの異なるアプローチ (a. 低濃度から段階的に濃度を上げる方法 step-wise method、b. 導入時より高濃度を間欠的に投与する方法 high-dose method) により長期暴露させ、複数の薬剤耐性株を樹立した(図 1)。

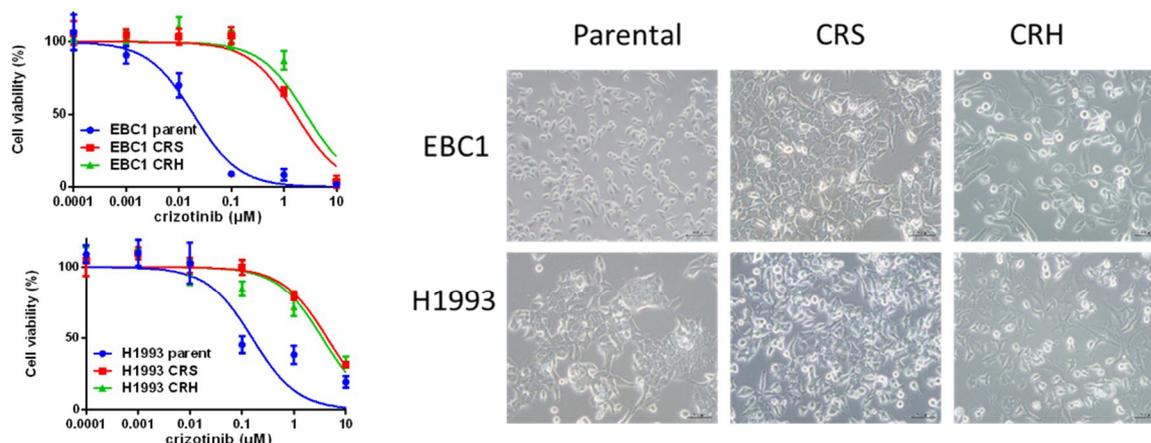


図 1. MET 阻害剤に対する耐性株の樹立

CRS: crizotinib resistant clone established by step-wise method
CRH: crizotinib resistant clone established by high-dose method

オミックス解析による耐性機序の探索

耐性候補分子の検証実験および機序の検証治療耐性を克服する治療法の探索

オミックス解析 (蛋白リン酸化キナーゼアレイ解析、網羅的がん関連遺伝子変異および発現プロファイル解析など) を実施し、耐性候補分子を抽出した。続いてそれら候補分子に対して in vitro での検証実験を行い、以下の複数の耐性機序を明らかにしその克服法を明らかにした。

i) EBC1-CRS: 遺伝子発現解析・キナーゼ蛋白リン酸化アレイ解析により、EBC1-CRS 細胞株では、MET 遺伝子・蛋白発現およびリン酸化の低下を認める一方で、EGFR の遺伝子・蛋白発現およびリン酸化の上昇を示した(図 2A)。それらの変化は、元々有していた MET 遺伝子のコピー数異常(増幅)が消失し、EGFR 遺伝子変異(Exon 19 deletion; E746_A750delELREA) およびコピー数異常(増幅)の獲得に起因することを明らかにした(図 2B, 2C)。すなわち EBC1-CRS 細胞株はゲノムレベルでの変化を介して、細胞の増殖・生存依存経路を MET シグナル経路から EGFR シグナル経路へスイッチすることにより耐性を獲得し、その克服法としては EGFR 阻害薬(アファチニブ)が有効であり、クリゾチニブとアファチニブの併用による強い増殖抑制効果を示すことを明らかにした(図 2D)。

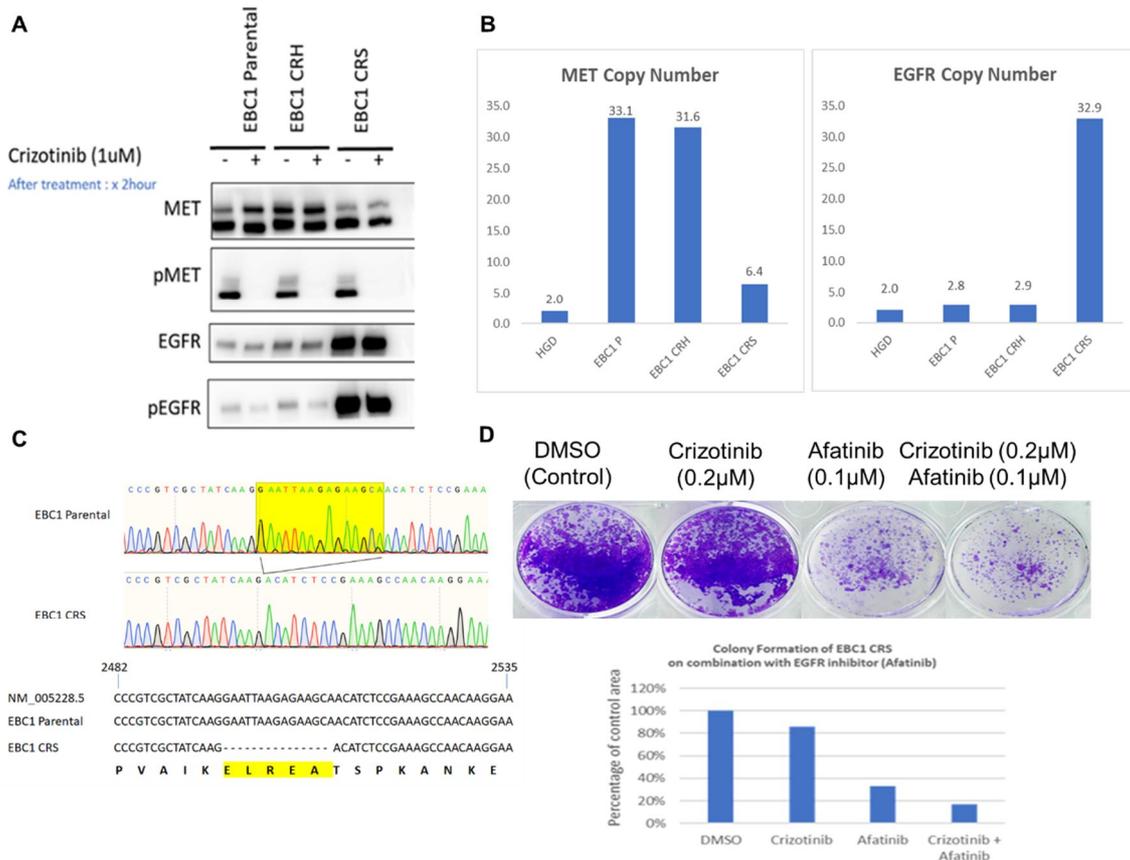


図2. EBC1-CRSの耐性機序の解明およびその克服

ii) EBC-CRH: 網羅的遺伝子発現解析の結果、EBC1-CRH 細胞株における SERPINE1 遺伝子の発現上昇が判明し、さらに蛋白レベルでの発現上昇も確認された(図 3A, 3B)。SERPINE1 は主にプラスミノゲンをプラスミンに変換する組織型プラスミノゲン活性化因子(tissue plasminogen activator: tPA)の酵素活性を阻害することにより、線維素溶解系(線溶系)を負に制御する作用が知られているが、一方で腫瘍の増殖や浸潤・転移への関与すること、SERPINE1 高発現がんは予後不良であることが報告されている。そこで薬剤耐性分子の候補として検証実験へ進めた。shRNA を用いて EBC1-CRH 細胞株の SERPINE1 の発現をノックダウンさせた安定株を作成し、クリゾチニブに対する感受性の変化を検討したところ、SERPINE1 ノックダウンにより耐性が一部解除されることが明らかになった(図 3C)。さらにクリゾチニブと SERPINE1 阻害剤 Tiplaxtinin を用いた併用実験においても同様の耐性解除が示された(図 3D, 3E)。公開データベース(KM-plotter database; <http://kmplot.com/analysis/>)を用いて、肺がんにおいて、SERPINE1 の発現レベルが生存期間に与える影響をみると、SERPINE1 (PAI1) の発現が高い肺がんでは有意に予後不良であることが判明した(図 3F)。これらの結果より、SERPINE1 の発現上昇がクリゾチニブに対する新規耐性獲得機序であることが示唆された。SERPINE1 を介する分子標的耐性獲得の報告はこれまでなく、今後さらに臨床検体を用いた検証が求められる。

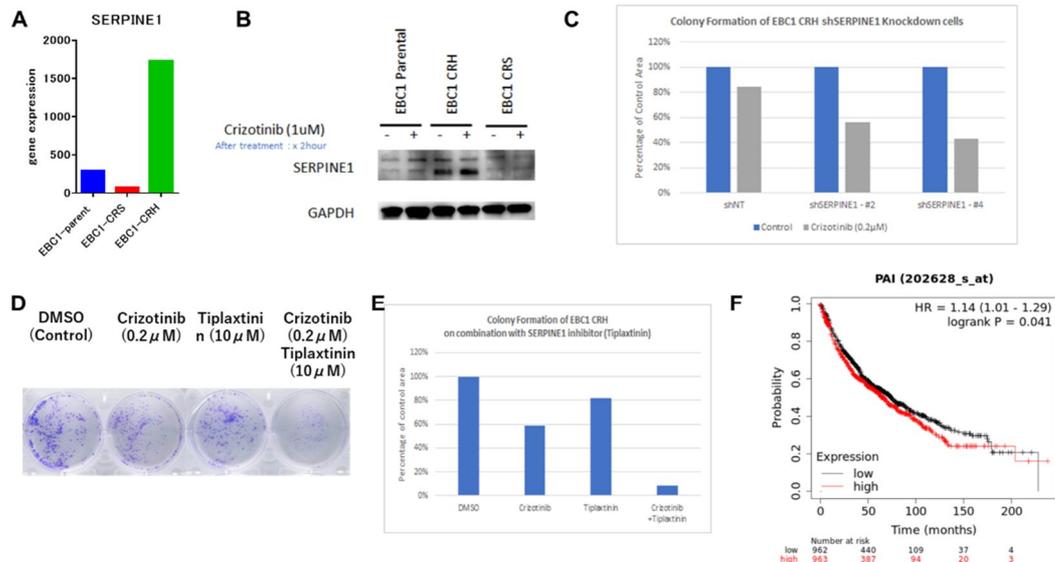


図3. EBC1-CRHの耐性機序の解明およびその克服

iii) H1993-CRH : H1993 -CRH 耐性株は耐性獲得により、その細胞形態は敷石状から紡錘形へと変化しており (図 4A)、蛋白レベルでの間葉系マーカーの上昇 (図 4B)、網羅的遺伝子発現データを用いた GSEA 解析解析では上皮間葉移行 (EMT) 関連遺伝子セットのエンリッチを認めた (図 4C)。これらより EMT による間葉系への形質転換を来していることが示された。EMT は代表的な薬剤耐性獲得機構として知られており、H1993-CRH においても EMT による耐性獲得が示唆された。さらに H1993-CRH では MEK-ERK シグナルの活性化が認められ (図 4D)、クリゾチニブに MEK 阻害剤であるトラメチニブを上乗せにすることにより強い増殖抑制効果を認めた (図 4E, 4F)。

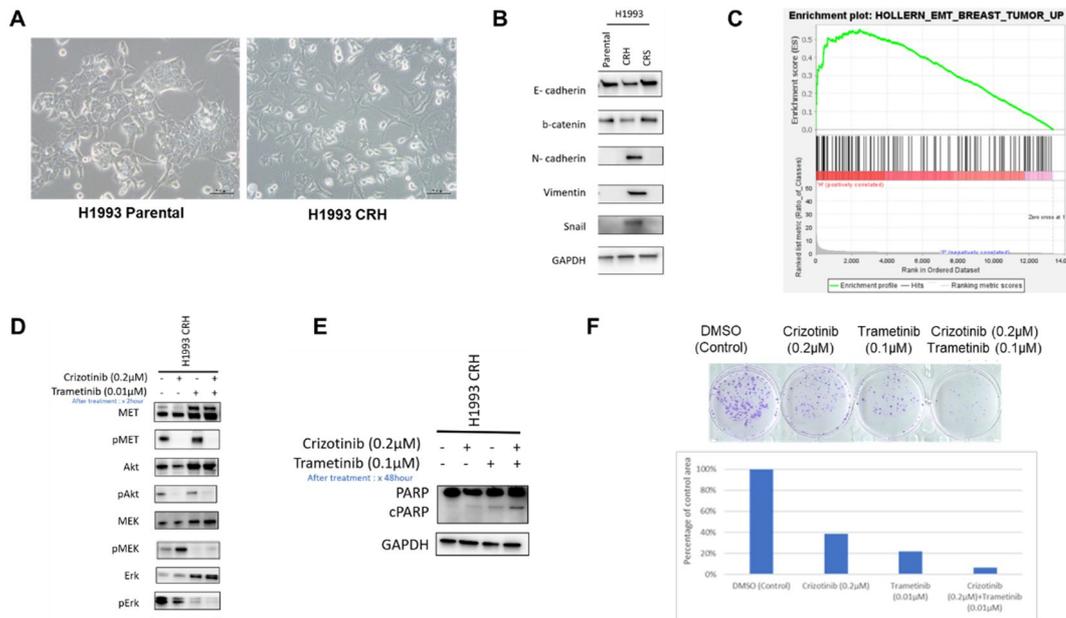


図4. H1993-CRHの耐性機序の解明およびその克服

なお、研究当初 Ba/F3 細胞を用いて MET exon14 スキッピングの isogenic モデルを樹立し、on-target (MET のキナーゼ領域) における 2 次変異による耐性獲得機構の探索を予定していたが、期待していた MET exon14 スキッピングをドライバーとする Ba/F3 細胞株の樹立は得られなかった。この結果から、MET exon14 スキッピングは単独ではドライバーとはなり得ず、別の関連分子が共発現することの必要性が示唆された。この知見は、MET exon14 スキッピングに対する新たな治療標的の発見につながる事が期待され、今後引き続き検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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