

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23930

研究課題名(和文) EGFR肺癌のdrug-tolerant cells形成機序解明による治療法創出

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of drug-tolerant cell formation in EGFR lung cancer

研究代表者

藤井 昌学 (Fujii, Masanori)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：30641758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は活性型EGFRによる肺腫瘍形成には  $\beta$ -cateninが必須であり、 $\beta$ -cateninは活性型EGFRと直接結合してチロシンリン酸化され、さらに活性型EGFR の存在下では非古典的経路であるYAP-TBX5経路の活性上昇を認めることを見出した。また活性型EGFR存在下ではSrc-family経路が活性化され、Src familyによる  $\beta$ -catenin-Y333チロシン残基のリン酸化が古典的経路からYAP-TBX5経路へのmolecular switchを引き起こし、抗アポトーシス関連遺伝子であるBcl2L1遺伝子等を制御し、DTPs形成に関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性型EGFR遺伝子変異陽性肺癌において、Drug-tolerant persisters(DTPs)形成の詳細なメカニズムの一端を明らかにし、DTPs形成阻害による、耐性克服の新たな治療方法創出が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)： $\beta$ -catenin, one of the key players in Wnt signalling, is known to play an important role in tumour development in colorectal cancer, etc. However, its role in lung cancer remains unclear. Our previous studies have shown that  $\beta$ -catenin is essential for lung tumourigenesis by active EGFR and that  $\beta$ -catenin binds directly to active EGFR and is tyrosine-phosphorylated. We found that the YAP-TBX5 pathway, which is different from the classical pathway, showed increased activity in the presence of active EGFR. The Src-family pathway is also activated in the presence of active EGFR, suggesting that phosphorylation of  $\beta$ -catenin-Y333 tyrosine residues by the Src family may cause a molecular switch from the classical pathway to the YAP-TBX5 pathway.  $\beta$ -catenin-YAP-TBX5 pathway regulates anti-apoptosis-related genes such as the Bcl2L1 gene, and suppression of these pathways may be a new therapeutic target in addition to the strategy of suppressing EGFR activity with EGFR-TKI.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR肺癌  $\beta$ -catenin Drug-tolerant persisters

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

第三世代 EGFR-TKI の一つであるオシメルチニブは臨床診療において活性型 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する第一選択薬となっている (Soria JC, et al. *N Engl J Med* 2018; 378: 113-125)。しかし、第一・第二世代と同様、第三世代 EGFR-TKI も耐性獲得が既に報告されてきている。

近年、ドライバー遺伝子変異陽性の細胞に分子標的薬を高濃度で曝露した際、幹細胞マーカー陽性の耐性細胞が少数生き残り (drug-tolerant persisters; DTPs) やがて新たな遺伝子変異を起こさずに増殖できるようになる (drug-tolerant expanded persisters; DTEPs) という現象が報告されている (Sharma SV et al. *Cell* 2010; 141(1): 69-80.)。活性型 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌においても同様の報告がされており (Hata AN, et al. *Nat Med*. 2016 Mar; 22(3): 262-269.) DTPs の形成を経て、耐性獲得に向かうものと考えられる。

しかしながら、活性型 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌において、依然 DTPs 形成の詳細なメカニズムは解明されていない。

### 2. 研究の目的

背景にて述べた最近の研究によれば、DTPs 形成において抗アポトーシス関連遺伝子 *Bcl2l1* の遺伝子産物である Bcl-x が key player であることが報告されている。さらに、申請者らは研究室の一つのテーマとして注力してきた「活性型 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌における  $\beta$ -catenin の役割」の1つとして、後述するように *Bcl2l1* 発現制御に繋がる幾つかの知見を得ている。本研究では、 $\beta$ -catenin シグナルに着目し、DTPs 形成のメカニズムの解明、さらには形成阻害による、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の治療に向けた新たなアプローチを創出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は申請者の研究室で樹立した培養細胞系およびモデルマウスを用い、分子生物学的、生化学的手法を駆使して行ってゆく。具体的には、期間内に1) 活性型 EGFR のチロシンリン酸化による  $\beta$ -catenin の機能制御機構の解明、2) チロシンリン酸化された  $\beta$ -catenin による DTPs 形成におけるメカニズムの解明、3) DTPs 形成阻害が、EGFR-TKI 耐性克服の新たなアプローチになり得るかの検証を行う。

### 4. 研究成果

1) 申請者らは、Bcl-x のノックアウトマウス作製および組み換え酵素 Cre を発現するマウスの作製を行った。これらと肺特異的に *EGFR-T790M-L858R* を発現し肺腫瘍を形成するマウスとの掛け合わせにより、Tet-on、Cre-loxP システムを用いた、肺癌発癌下にて Bcl-x のコンディショナルノックアウトが可能な遺伝子改変マウスの作製を行った (図1)。

このマウスを用いて、オシメルチニブ耐性マウスモデルの確立のため、第一世代 EGFR-TKI における耐性マウスモデル作製に準じて試みたところ (Pirazolli et al, *Cold Spring Harb Protoc*; 2014; doi:10.1101/prot077842)

コントロール群である Wild-type マウスでは耐性が半数に認められたものの、Bcl-x ノックアウトマウスにおいては全例で耐性は全例で耐性は認められなかった (表1)。

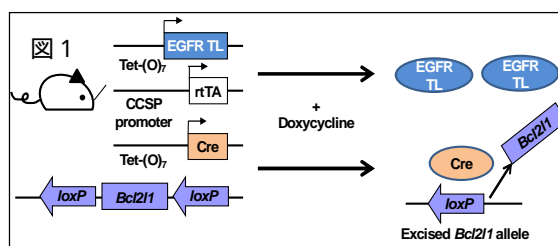
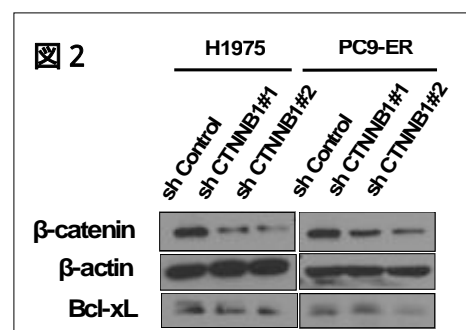


表 1

Mice Phenotype		Mice detected tumors	total
I	EGFR-TM-LR, CC10rtTA, Cre, Bclx WT/WT	4	8
II	EGFR-TM-LR, CC10rtTA, Cre, Bclx WT/F	4	6
III	<b>EGFR-TM-LR, CC10rtTA, Cre, Bclx F/F</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
IV	CC10rtTA, Cre, Bclx WT/WT	0	5

2) 次に、我々は Mass spectrometry を用いて活性型 EGFR による  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化残基の同定を試み、4つのチロシンリン酸化残基が  $\beta$ -catenin の安定化に關与することを見出した(量的制御)。さらに EGFR-TKI による EGFR シグナル阻害後も Ror1-Src 経路の活性化により、 $\beta$ -catenin-Y333 チロシン残基のリン酸化を受け(質的制御)、両方の支配を受けることで局在の制御・核移行等、機能制御されていることを細胞株で明らかにした。

3) 一方、活性型 EGFR 遺伝子変異を持つ代表的な細胞株において、 $\beta$ -catenin の遺伝子である *CTNNB1* を shRNA を用いてノックダウンすると、Bcl-xL の発現が抑制されることを見出した(図 2)。同様に申請者らの作製した *CTNNB1* コンディショナルノックアウトマウス (Nakayama S, et al. *Cancer Res.* 2014; 74(20): 5891-902.)においても同様に Bcl-xL の著明な発現低下が認められている。これらは  $\beta$ -catenin と Bcl-x (DTPs 形成) の関係を示唆するものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hara Naofumi, Ichihara Eiki, Kano Hirohisa, Ando Chihiro, Morita Ayako, Nishi Tatsuya, Okawa Sachi, Nakasuka Takamasa, Hirabae Atsuko, Abe Masaya, Asada Noboru, Ninomiya Kiichiro, Makimoto Go, Fujii Masanori, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 CDK4/6 signaling attenuates the effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2098 ~ 2112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-23-99	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 Shibahara Daisuke, Akanuma Naoki, Kobayashi Ikei S., Heo Eunyoung, Ando Mariko, Fujii Masanori, Jiang Feng, Prin P. Nicholas, Pan Gilbert, Wong Kwok Kin, Costa Daniel B., Bararia Deepak, Tenen Daniel G., Watanabe Hideo, Kobayashi Susumu S.	4. 巻 114
2. 論文標題 TIP60 is required for tumorigenesis in non small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2400 ~ 2413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15785	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 該当する

1. 著者名 Ando Chihiro, Ichihara Eiki, Nishi Tatsuya, Morita Ayako, Hara Naofumi, Takada Kenji, Nakasuka Takamasa, Watanabe Hiromi, Kano Hirohisa, Nishii Kazuya, Makimoto Go, Kondo Takumi, Ninomiya Kiichiro, Fujii Masanori, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Matsuoka Ken ichi, Hotta Katsuyuki, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 114
2. 論文標題 Efficacy of gilteritinib in comparison with alectinib for the treatment of <i>ALK</i> rearranged non small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4343 ~ 4354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15958	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 Nakasuka Takamasa, Ohashi Kadoaki, Nishii Kazuya, Hirabae Atsuko, Okawa Sachi, Tomonobu Nahoko, Takada Kenji, Ando Chihiro, Watanabe Hiromi, Makimoto Go, Ninomiya Kiichiro, Fujii Masanori, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Kumon Hiromi, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 178
2. 論文標題 PD-1 blockade augments CD8+ T cell dependent antitumor immunity triggered by Ad-SGE-REIC in Egfr-mutant lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2023.01.018	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 Makimoto Go, Shimonishi Atsushi, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Higo Hisao, Kato Yuka, Fujii Masanori, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Successful and Prompt Treatment with Tepotinib for Lung Adenocarcinoma Harboring MET Exon 14 Skipping Mutation Combined with Lung Abscess Formation: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 494~498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000524326	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 Taoka Masataka, Makimoto Go, Umakoshi Noriyuki, Ninomiya Kiichiro, Higo Hisao, Kato Yuka, Fujii Masanori, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Ohashi Kadoaki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Massive hemoptysis in a post-operative patient with recurrent lung cancer successfully treated by the combination therapy of Endobronchial Watanabe Spigot and bronchial artery embolization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101669~101669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2022.101669	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 Eguchi Takanori, Sheta Mona, Fujii Masanori, Calderwood Stuart K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcancer.2022.01.003	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 Kashima Yukie, Shibahara Daisuke, Suzuki Ayako, Muto Kyoko, Kobayashi Ikei S., Plotnick David, Udagawa Hibiki, Izumi Hiroki, Shibata Yuji, Tanaka Kosuke, Fujii Masanori, Ohashi Akihiro, Seki Masahide, Goto Koichi, Tsuchihara Katsuya, Suzuki Yutaka, Kobayashi Susumu S.	4. 巻 81
2. 論文標題 Single-Cell Analyses Reveal Diverse Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4835 ~ 4848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2811	査読の有無 無
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 Fujimoto Yumi, Morita Tomoko Yamamori, Ohashi Akihiro, Haeno Hiroshi, Hakozaiki Yumi, Fujii Masanori, Kashima Yukie, Kobayashi Susumu S., Mukohara Toru	4. 巻 10
2. 論文標題 Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78646-y	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 Pedro E.N. S. Vasconcelos, Gergis C, Viray H, Varkaris A, Fujii M, Rangachari D, VanderLaan PA, Kobayashi IS, Kobayashi SS, Costa DB	4. 巻 1
2. 論文標題 EGFR-A763_Y764insFQEA is a unique exon 20 insertion mutation that displays sensitivity to approved and in-development lung cancer EGFR tyrosine kinase inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Takei Hisashi, Fukuda Hirofumi, Pan Gilbert, Yamazaki Hiroyuki, Matsumoto Tadahiko, Kazuma Yasuhiro, Fujii Masanori, Nakayama Sohei, Kobayashi Ikei S., Shindo Keisuke, Yamashita Riu, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi, Kobayashi Susumu S.	4. 巻 112
2. 論文標題 Alternative splicing of APOBEC3D generates functional diversity and its role as a DNA mutator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 395-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02904-y	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
---------	---------