

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16398

研究課題名（和文）EGFRエクソン20挿入変異陽性肺癌に対する治療戦略の新展開

研究課題名（英文）New Therapeutic Strategies for EGFR Exon 20 Insertion Mutation-Positive Lung Cancer

研究代表者

西野 将矢（NISHINO, MASAYA）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40709664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本邦癌死因第一位の肺癌のなかでEGFR遺伝子変異陽性肺癌に対する分子標的治療の有効性が確立されて久しい。その中でもEGFRエクソン20挿入変異に関しては有効な治療法が確立されていない。エクソン20挿入変異肺癌細胞モデルを樹立し、それらに対して有効な分子標的治療薬を模索すること、耐性化機序を明らかとすることを目的とした。poziotinib、tarloxotinibがこれら肺癌モデル細胞に対して有効であり、かつENUを用いた耐性化二次変異誘発にて、EGFR T790MとC797Sを耐性化二次変異として同定した。さらに新規薬剤mobocertinibについても評価を行い、有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は全がん腫の中でも増加傾向にあり、本邦においても死亡者数は年間約8万人に上り、がん死亡数の第1位となっている。EGFR遺伝子変異陽性肺癌は全肺癌の約25%（全肺癌の約半数を占める肺腺がんの約5割）に認められると推計され、EGFR変異肺癌のうちの約10%をEGFRエクソン20挿入変異陽性肺癌が占める。このため、概算ではあるが毎年2000人がEGFRエクソン20挿入変異を有する肺癌で死亡していることとなる。しかし上述の通り、EGFRエクソン20挿入変異を有する肺癌に対する有効な分子標的治療薬は確立されておらず、EGFR-TKIによる恩恵を受けられていない患者群である。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer is the leading cause of cancer death in Japan, and the efficacy of molecular targeted therapy for EGFR mutation-positive lung cancer has long been established. Among these, no effective therapy has been established for EGFR exon 20 insertion mutations. We established exon 20 mutant lung cancer cell models and sought to identify effective molecular targeted therapies against them and to clarify the mechanism of resistance. poziotinib and tarloxotinib were found to be effective against these lung cancer cell models, and resistant secondary mutation induction using ENU We identified EGFR T790M and C797S as resistant secondary mutations by ENU induction. In addition, a novel drug, mobocertinib, was also evaluated and shown to be effective.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR遺伝子変異陽性肺癌 エクソン20挿入変異 分子標的治療薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EGFR 変異陽性肺癌に対する TKI 治療について

近年、多くの新規薬剤が肺癌治療に臨床応用されてきたが、肺癌は依然として本邦がん死亡原因の第1位である。ドライバー変異を有する進行・再発肺癌 (EGFR 肺癌、ALK 肺癌、ROS1 肺癌など) に対する第一選択薬は、それぞれのドライバー変異を抑制する分子標的治療薬 (それぞれ EGFR-TKI、ALK-TKI、ROS1-TKI など) である。これらのドライバー変異陽性肺癌のうち、最も頻度が高いものが EGFR 変異肺癌であり、本邦肺腺がんの 5 割程度を占めるとされている。EGFR 変異肺癌に対しては、第1世代～第3世代の EGFR-TKI がこれまでに開発されており、2023 年現在、FLAURA 試験の結果などを受けて[1]、本邦では第3世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブが第一選択薬として用いられることが多い。しかし、EGFR 変異肺癌のうち、後述するエクソン 20 挿入変異を有する肺癌は、一部の例外を除いて、第1～第3世代 EGFR-TKI に耐性を示すことが知られている。

Exon 20 肺癌に対する研究開始当初の治療開発について

肺癌は全がん腫の中でも増加傾向にあり、本邦においても死亡者数は年間約 8 万人に上り、がん死亡数の第1位となっている。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌は全肺癌の約 25% (全肺癌の約半数を占める肺腺がんの約 5 割) に認められると推計され、EGFR 変異肺癌のうちの約 10% を EGFR エクソン 20 挿入変異陽性肺癌が占める (図 1)。このため、概算ではあるが毎年 2000 人が EGFR エクソン 20 挿入変異を有する肺癌で死亡していると計算され、これは部位別がん死亡数で喉頭・皮膚・甲状腺を超えており、肺癌の中ではサブセットに過ぎないとはいえ、対策が必要と考えられる。しかし上述の通り、EGFR エクソン 20 挿入変異を有する肺癌に対する有効な分子標的治療薬は確立されておらず[2-4]、EGFR-TKI による恩恵を受けられていない患者群である。

この EGFR エクソン 20 挿入変異を有する肺癌に対しても複数の新薬が開発中である。たとえば第2世代 EGFR-TKI のひとつである poziotinib は、限定的ではあるが EGFR エクソン 20 挿入変異を有する肺癌への効果が報告されている[5]。しかし poziotinib は、皮膚や腸管上皮にも発現している野生型 EGFR をも強力に阻害するため、重篤な皮膚や胃腸の副作用も懸念されている[6]。第2世代 EGFR-TKI の副作用における欠点を克服すべく開発中の薬剤が tarloxotinib である。Tarloxotinib は低酸素活性化プロドラッグであり、固形癌に多く見られる癌周囲の低酸素状態 (酸素濃度 0.1% 未満) においてのみ強力な活性体 (tarloxotinib-E) を放出するよう設計されている[7, 8]。Tarloxotinib を用いた早期臨床試験では、EGFR エクソン 20 挿入のコホートにおいても 6/11 人 (55%) の患者で病勢が安定したことが報告されている[9]。これらの薬剤に加え、新規治療薬の開発も進められている。

2. 研究の目的

(1) さまざまなエクソン 20 挿入バリエーションにおける新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) の有効性の評価

EGFR エクソン 20 挿入変異は、その挿入されるアミノ酸や同時に欠失・置換されるアミノ酸によってさまざまなバリエーションが存在する。また、サブタイプごとに EGFR-TKI に対する感受性が異なるという報告もなされている[10]。研究開始時点において、COSMIC データベースで調べたところ、頻度が上位 5 つのバリエーションは表 1 の通りであり、これらの 5 つで EGFR エクソン 20 挿入変異の 72.2% を占めていた。Tarloxotinib-E や poziotinib の効果が、これらのバリエーション毎に異なる可能性もあり、各バリエーションについて新規 TKI の効果を調べることをひとつの目的とした。

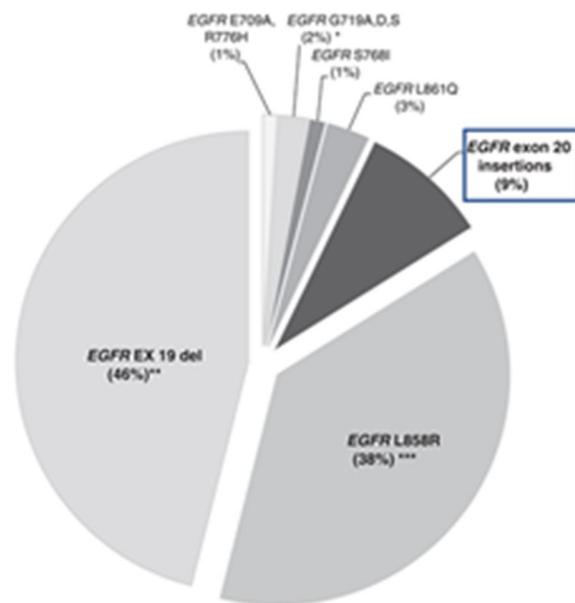
(2) 新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) に対する獲得耐性機序の探索

Tarloxotinib-E または poziotinib を用いた場合にも、これまでの他の分子標的治療薬と同様、獲得耐性の出現は不可避と考えられる。獲得耐性の主な機序のひとつとして、標的遺伝子の 2 次変異が報告されており、Tarloxotinib-E および poziotinib に耐性をもたらし得る 2 次変異について探索することを目的のふたつとした。

(3) 研究期間中に開発された薬剤の有効性の評価

本研究の実施期間中にも、さまざまな新規分子標的治療薬が開発されることが期待されており、それらの新規薬剤についても、その有効性や獲得耐性機序を評価することを 3 つ目の目的とした。

3. 研究の方法



Arcila ME, et al. Mol Cancer Ther. 2013.

図1 EGFR遺伝子変異の内訳

表1 EGFRエクソン20挿入変異の種類と頻度

頻度	サブタイプ	報告例 (%)
1	V769insASV	89 29.5
2	D770insSVD	61 20.2
3	H773insNPH	34 11.2
4	H773insH	18 6.0
5	A763insFQEA	16 5.3
	Others	84 27.8

(1) さまざまなエクソン 20 挿入バリエーションにおける新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) の有効性の評価

エクソン 20 挿入変異を有する Ba/F3 モデルの作成

マウスの proB 細胞である Ba/F3 を用いて上記 5 種類の EGFR エクソン 20 挿入バリエーションにその生存・増殖を依存した細胞株モデルを作成した。もともと Ba/F3 細胞株は、IL-3 依存性に生存および増殖を示す細胞株である。その特性を利用して、レトロウイルスベクターを用いて Driver 遺伝子変異を Ba/F3 に導入することで、IL-3 非依存性に生存および増殖能を獲得した Driver 遺伝子変異モデルの樹立を行った。樹立した EGFR エクソン 20 挿入変異モデルに対し、tarloxotinib-E や poziotinib を含む各種 TKI の治療効果について、以下のように MTT アッセイを行い評価した。

96 ウェルの各ウェルに 2000 個のトランスフェクトされた Ba/F3 細胞を播種した。その後、DMSO または規定された薬剤濃度の TKI を添加し、さらに 72 時間培養した。Cell Counting Kit-8 試薬を用いて、各薬剤の増殖阻害効果をプロトコールに従って比色アッセイで推定した。各実験は 3 回ずつ行った。

(2) 新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) に対する獲得耐性機序の探索

新規 EGFR-TKI に対する獲得耐性株は、ENU (Sigma-Aldrich) 変異誘発法を用いて樹立した。ENU 曝露は 100 μg/ml の濃度で 24 時間行い、その後 ENU を除去したのち、tarloxotinib-E (200 nM) または poziotinib (200 nM) の存在下で 96 ウェルプレートの 24 ウェルに 5000 細胞を播種した。これらのプレートを週 2 回培地交換しながら 2 週間培養し、生存するクローンを単離した。耐性細胞を樹立した後、gDNA を抽出し、サンガーシーケンスにてエクソン 18-21 間の EGFR 二次変異を探索した。

(3) 研究期間中に開発された薬剤の有効性の評価

本研究期間中に、新規 EGFR-TKI である mobocertinib が EGFR エクソン 20 挿入変異を有する肺がんにも有効であることが示され、米国 FDA でも承認された。このため、上記で樹立した 5 種類の EGFR エクソン 20 挿入変異肺がんモデルを用いて、mobocertinib の有効性についても検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) の有効性の評価

Ba/F3 細胞を用いた EGFR エクソン 20 挿入変異ごとの各種薬剤の感受性を以下に示す。

表 2 . Ba/F3 細胞による EGFR エクソン 20 挿入変異ごとの感受性一覧

IC ₅₀ (nM)	erlotinib	afatinib	poziotinib	osimertinib	tarloxotinib (pro-drug)	tarloxotinib-E (活性体)
A763insFQEA	31.4	0.7	<u>0.7</u>	14.6	15.2	<u><0.5</u>
V769insASV	>1000	35.5	<u>4.8</u>	118.4	675.9	<u>7.6</u>
D770insSVD	>1000	86.0	<u>2.7</u>	184.7	990.1	<u>7.3</u>
H773insNPH	>1000	35.8	<u>2.2</u>	61.9	714.0	<u>9.9</u>
H773insH	645.8	325	<u>22.8</u>	77.7	>1000	<u>73.1</u>

afatinib、poziotinib、osimertinib、tarloxotinib、tarloxotinib-E の有効性を、細胞増殖抑制アッセイを用いて評価した結果 (表 2) 解析したすべての EGFR エクソン 20 挿入変異モデルにおいて、IC₅₀ は tarloxotinib が tarloxotinib-E よりも 72.1 倍以上高く、このプロドラッグ戦略による広い治療域が示された。カットオフ値を 10 nM (オシメルチニブは臨床的に達成可能な濃度が高いため 50 nM) とした場合、A763insFQEA 細胞株モデルは、検討したすべての EGFR-TKI に対して感受性を示した。一方、V769insASV、H770insSVD、H773insNPH を有する Ba/F3 細胞は、tarloxotinib-E と poziotinib に感受性があったが、afatinib と osimertinib には抵抗性を示した。新規 EGFR-TKI を含め、いずれの EGFR-TKI も H773insH 細胞株モデルに対する有効性は示せなかった。

(2) 新規 EGFR-TKI (Tarloxotinib-E および poziotinib) に対する獲得耐性機序の探索

Tarloxotinib-E を慢性的に曝露した結果、62 個の Tarloxotinib-E 耐性クローンが得られた。また、poziotinib についても同様に獲得耐性株の樹立を行い、57 個の poziotinib 耐性クローンも樹立した。A763insFQEA を持つ Ba/F3 細胞モデルは tarloxotinib-E に非常に感受性が高く、耐性クローンは 1 つ (C797S を獲得) しか得られなかった。V769insASV を持つ Ba/F3 細胞モデルでは、14 個の tarloxotinib-E 耐性クローン全てと 15 個の poziotinib 耐性クローン全てが T790M 変異を獲得していた。D770insSVD を持つ Ba/F3 細胞モデルでは、24 個の tarloxotinib-E 耐性クローン全てと 20 個の poziotinib 耐性クローンが C797S 変異を獲得していた。H773insNPH を持つ Ba/F3 細胞モデルでは、Tarloxotinib-E 耐性クローン 23 個中 22 個、poziotinib 耐性クローン 22 個中 21 個が T790M 変異を生じ、その他のクローンは C797S 変異を有していた (図 2) 。

(4) その他の研究結果

当科では EGFR Exon20 肺がんモデル以外にも、同様に Ba/F3 株を用いた獲得耐性研究も実施しており、これらの研究にも一部携わった。例えば、KRAS G12C 変異モデルでは、2 種類の KRAS G12C 阻害剤について検討をおこない、さまざまな 2 次的変異がそれぞれの阻害剤に対し耐性をもたらし得ることを同定した(図 3)。また、Exon20 肺がんモデルに対する mobocertinib の獲得耐性機序を探索する研究にも一部関与した。

参考文献リスト

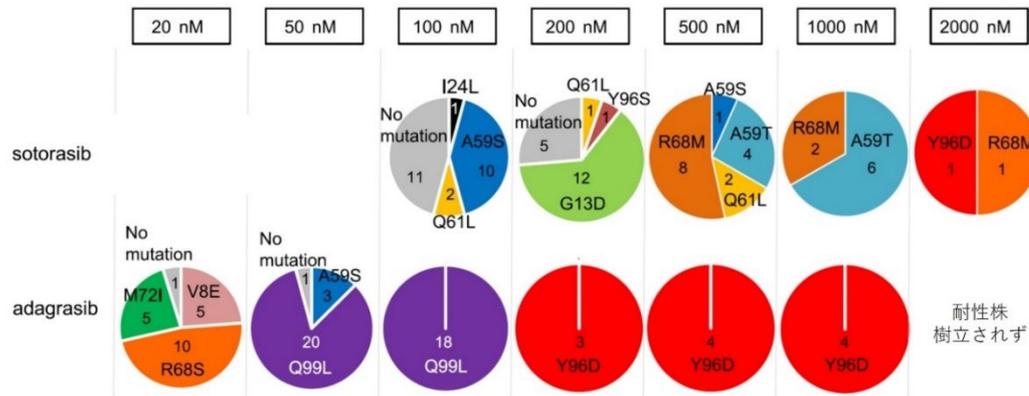


図3. KRAS G12C変異モデルに対するソトラシブとアダグラシブを用いた耐性誘導実験。各濃度で検出された2次的変異の種類を、薬剤別に示す。

1. Soria, J.C., et al., *Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2018. **378**(2): p. 113-125.
2. Naidoo, J., et al., *Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib*. Cancer, 2015. **121**(18): p. 3212-3220.
3. Yang, J.C.-H., et al., *Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials*. The Lancet Oncology, 2015. **16**(2): p. 141-151.
4. van Veggel, B., et al., *Osimertinib treatment for patients with EGFR exon 20 mutation positive non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2020. **141**: p. 9-13.
5. Koga, T., et al., *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, 2018. **126**: p. 72-79.
6. Heymach, J., et al., *OA02.06 A Phase II Trial of Poziotinib in EGFR and HER2 exon 20 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)*. Journal of Thoracic Oncology, 2018. **13**(10): p. S323-S324.
7. Patterson, A., et al., *The hypoxia-activated EGFR-TKI TH-4000 overcomes erlotinib-resistance in preclinical NSCLC models at plasma levels achieved in a phase 1 clinical trial*. AACR Annual Meeting 2015, Abstract# 5358., 2015.
8. Adriana Estrada-Bernal, et al., *Tarloxotinib is a hypoxia-activated pan-HER kinase inhibitor active against a broad range of HER-family oncogenes*. Clinical Cancer Research, 2020 **accepted**.
9. Liu, S.V., et al., *LBA61 First analysis of RAIN-701: Study of tarloxotinib in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) EGFR Exon 20 insertion, HER2-activating mutations & other solid tumours with NRG1/ERBB gene fusions*. Annals of Oncology, 2020. **31**: p. S1189.
10. Kosaka, T., et al., *Response Heterogeneity of EGFR and HER2 Exon 20 Insertions to Covalent EGFR and HER2 Inhibitors*. Cancer Res, 2017. **77**(10): p. 2712-2721.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishino Masaya, Suda Kenichi, Koga Takamasa, Ohara Shuta, Fujino Toshio, Soh Junichi, Tirunagaru Vijaya, Vellanki Avanish, Doebele Robert C., Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Activity of tarloxotinib E in cells with EGFR exon 20 insertion mutations and mechanisms of acquired resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1511 ~ 1516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.13931	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 該当する

〔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
---------	---------