

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17213

研究課題名(和文) EGFR変異肺癌髄膜癌腫症モデルにおけるオシメルチニブ抵抗性克服を目指した研究

研究課題名(英文) osimertinib resistance leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR-mutant model

研究代表者

大谷 咲子(Otani, Sakiko)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60439081

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)：髄膜癌腫症(LMC)における第3世代EGFR-TKIであるオシメルチニブ耐性機構の解明および克服を目的とした。ゲフィチニブ耐性後オシメルチニブにも耐性化したLMC in vivo イメージングモデルから樹立したがん細胞株(G-OR#2)を用いて実験を進めた。G-OR#2は次世代ゲノムシーケンサー(NGS)においてKRAS-G12V変異を検出した。in vitroにおいてG-OR#2はMEK阻害薬(トラメチニブ)をオシメルチニブと併用したところ細胞増殖抑制を認めた。また、LMCモデルにおいてもトラメチニブとの併用で腫瘍の進展抑制が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オシメルチニブは、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に対する標準治療薬であり、約70%の症例において奏効することが知られている。髄液移行性も高く中枢神経系(CNS)病変に対する有効性も高い一方、長期治療中に髄膜癌腫症や脳転移等のCNS転移が耐性獲得による病勢増悪の場となり患者のQOLを著しく低下させることが多い。本研究では、オシメルチニブ耐性LMC in vivo イメージングモデルから樹立したがん細胞株(GOR#2)よりKRAS-G12V変異を検出し、in vivoにおいてオシメルチニブとMEK阻害薬との併用で耐性を克服できる可能性が示されたことに大きな意義があるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of resistance to osimertinib, a third-generation EGFR-TKI, in Leptomeningeal carcinomatosis (LMC) and seek a novel therapeutic strategy. We induced osimertinib resistance in a mouse model of LMC using an EGFR-mutant NSCLC cell line (PC9) by continuous oral osimertinib treatment, established resistant cells and examined the resistance mechanism using next-generation sequencing. We detected the KRAS-G12V mutation in resistant cells. Experiments involving KRAS knockdown in resistant cells and KRAS-G12V overexpression in parental cells revealed the involvement of KRAS-G12V in osimertinib resistance. Cotreatment with trametinib and osimertinib resensitized the cells to osimertinib. Furthermore, in the mouse model of LMC with resistant cells, combined osimertinib and trametinib treatment successfully controlled LMC progression. These findings suggest a potential novel therapy against KRAS-G12V-harboring osimertinib-resistant LMC in EGFR-mutant NSCLC.

研究分野：胸部腫瘍

キーワード：EGFR陽性肺癌 髄膜癌腫症 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

脳転移や髄膜癌腫症（LMC）などの中枢神経系（CNS）転移は分子標的薬耐性が生じやすく、耐性化した CNS 転移の増悪は患者の QOL および生命予後に直結する。第3世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）であるオシメルチニブは、EGFR 肺癌に対し、第1・第2世代 EGFR-TKI を上回る奏効率が得られるだけでなく、全生存期間の延長を期待できる薬剤である。髄液移行性も高く CNS 病変に対する有効性も高い一方、長期の治療により耐性となり再発症例が徐々に問題となりつつある。その耐性機構の解明および耐性を克服する治療戦略の構築が課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、最も臨床的に治療に難渋する EGFR 変異肺癌の LMC に焦点を絞り、LMC におけるオシメルチニブ耐性機構を解明し、耐性を克服する治療法を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

先行研究においてマウス髄腔内にルシフェラーゼ遺伝子を導入した EGFR 肺癌株（PC9）を移植し、オシメルチニブを連日経口投与し、再発した腫瘍から3種類の細胞株（O-OR、G-OR #1/#2）を樹立していた。これら細胞株を用いて実験を進めた。

（1）耐性因子の同定

Western Blot 法（WB）により耐性株 G-OR#2 では ERK のリン酸化が亢進していることを発見した。MAPK/ERK 経路が耐性の一因となっている可能性が考えられた。その後行った耐性株の次世代ゲノムシーケンサー（NGS）解析では、G-OR#2 において KRAS-G12V 変異を検出した。G-OR #2 を siRNA により KRAS 発現を抑制するとオシメルチニブへの感受性が回復したことから KRAS-G12V が耐性因子の一つであることを明らかにした。

（2）*In vitro* における耐性克服の検討

G-OR #2 をクローニングし、KRAS-G12V 変異の頻度が高い細胞株を用いて *in vitro* の検討を行った。これら細胞株においてオシメルチニブに対する体制を確認するとともに、siRNA により KRAS 発現を抑制するとオシメルチニブへの感受性が回復した。また、PC9 に KRAS-G12V 遺伝子導入をした細胞株においてオシメルチニブ感受性が低下し ERK のリン酸化が亢進していることを示した。さらに MEK 阻害剤であるトラメチニブをオシメルチニブと併用すると細胞増殖が抑制されることを確認した。

（3）*In vivo* LMC マウスモデルにおける耐性克服の検討

G-OR#2（クローン #31）を髄腔内に移植した LMC マウスモデルにおいて、オシメルチニブとトラメチニブの併用効果を検討した。

4. 研究成果

先行研究において EGFR 変異肺がん髄膜がん腫症の in vivo イメージングモデルから、初回治療のオシメルチニブに耐性化した肺がん細胞株（1次治療耐性モデル; O-OR）と、第1世代 EGFR-TKI であるゲフィチニブ耐性後にオシメルチニブにも耐性化した肺がん細胞株（2次治療耐性モデル; G-OR#1/#2）を

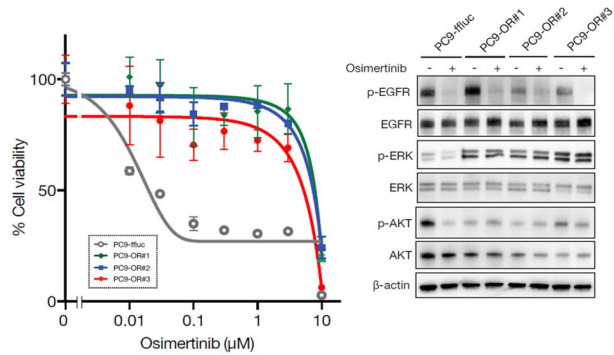


図1 耐性株の樹立

既に樹立した(図1)。これら細胞株について siRNA による EGFR 発現抑制を行っても増殖能は変わらず EGFR 非依存性を確認した。また、RTK シグナル活性について確認すると耐性株では ERK のリン酸化が亢進していた(図1)。次世代ゲノムシーケンサーを用いた解析では G-OR#2 について KRAS-G12V 変異を検出した。

G-OR#2 をクローニングし、KRAS-G12V 変異の頻度の高かった 3 つの細胞株 (#26, #31, #33) を用いてオシメルチニブの耐性を確認した(図2a)。siRNA による KRAS 発現抑制でオシメルチニブへの感受性が回復することを確認した(図2b)。また、PC9 に KRAS-G12V を遺伝子導入するとオシメルチニブの感受性が低下し、ERK のリン酸化が亢進していることを見出した。MEK 阻害剤であるトラメチニブ存在下では ERK のリン酸化は抑制された。さらに、KRAS-G12V クローン(#26, #31, #33)においてもオシメルチニブにトラメチニブを併用することによりオシメルチニブ感受性が回復し72 時間後にアポトーシスマーカーが増強していることを確認した(図2c)。

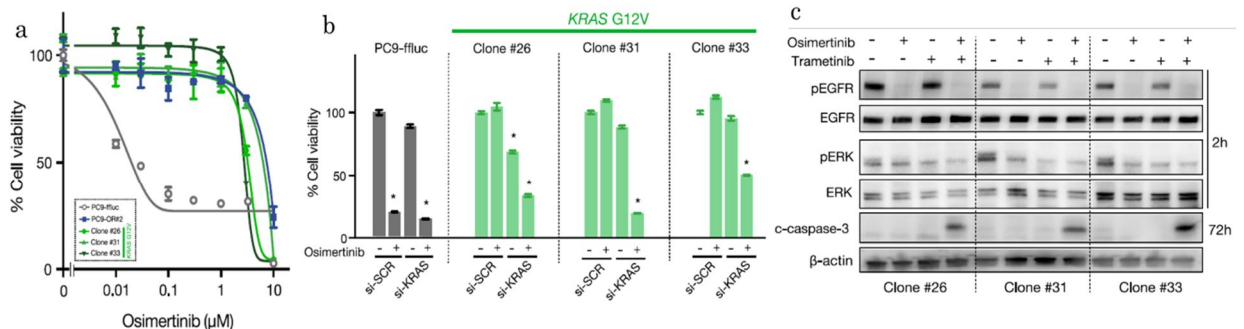


図2

KRAS-G12V クローン(#31)の LMC モデルを用いた in vivo においてオシメルチニブにトラメチニブを併用すると LMC の進行を抑制することが示された(図3)。なお、毒性による体重減少は認められなかった。

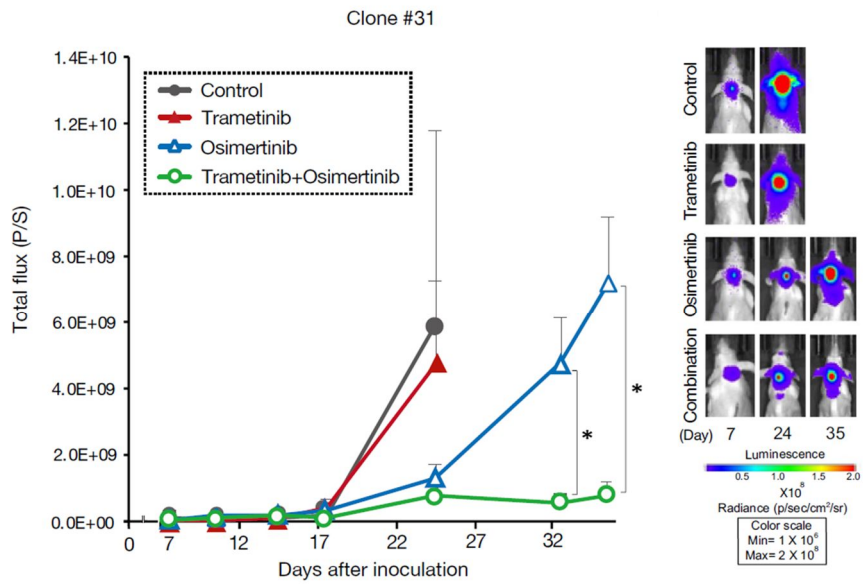


図3 *in vivo*における耐性克服

本研究では、マウス LMC モデルからオシメルチニブ耐性株を樹立し、その耐性機序の一つとして KRAS-G12V 変異が検出されることを明らかにした。さらに、MEK 阻害剤であるトラメチニブを併用することでオシメルチニブ耐性を克服できる可能性を示唆した。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Fukuda Koji, Otani Sakiko, Takeuchi Shinji, Arai Sachiko, Nanjo Shigeki, Tanimoto Azusa, Nishiyama Akihiro, Naoki Katsuhiko, Yano Seiji | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Trametinib overcomes KRAS G12V-induced osimertinib resistance in a leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR mutant lung cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 3784 ~ 3795 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15035 | 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|