

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08179

研究課題名(和文) SHP2による薬剤toleranceを標的とした肺がん根治的治療の開発

研究課題名(英文) Development of lung cancer treatment targeting drug tolerance by SHP2.

研究代表者

市原 英基 (Ichihara, Eiki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40549705

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)：肺がん分子標的治療に対するtoleranceにおけるSHP2の役割を明らかとした。ALK・ROS1・EGFR遺伝子異常を有する各肺がん細胞株を用いた。各分子標的治療薬暴露下に残存しtoleranceを示すがん細胞は、SHP2阻害により著しく阻害されることを細胞株モデルおよび皮下腫瘍マウスモデルを用いて示した。さらにSHP2は細胞周期関連因子RB活性を維持しており、分子標的治療下の細胞周期を維持しtoleranceを誘導することを示した。分子標的治療薬暴露下にSHP2を阻害するとRB活性が強力に抑制された。細胞周期関連因子CDK4/6を阻害するとSHP2阻害と同様にtoleranceを阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により肺がん分子標的治療における薬剤toleranceにおいてSHP2が重要な役割を果たすことが明らかとなった。SHP2を標的とすることで、肺がん分子標的治療においてこれまで困難とされていた根治的効果を持つ治療開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The role of SHP2 in tolerance to molecularly targeted lung cancer therapies was investigated using lung cancer cell lines with ALK, ROS1 and EGFR gene abnormalities. Using cell line and subcutaneous tumour mouse models, we showed that cancer cells that remained tolerant under exposure to the respective molecular-targeted therapies were significantly inhibited by SHP2 inhibition. Furthermore, SHP2 maintains cell cycle-associated factor RB activity and induces tolerance by maintaining the cell cycle under molecularly-targeted therapy. Inhibition of SHP2 under exposure to molecularly targeted therapies strongly suppressed RB activity. Inhibition of the cell cycle-associated factor CDK4/6 inhibited tolerance as well as SHP2 inhibition.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 分子標的治療 tolerance SHP2 RB

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんでは、がんの原因となる様々な遺伝子異常(EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子など)に対応した分子標的薬が優れた抗腫瘍効果を発揮する。しかし、drug tolerant 細胞と呼ばれしつこく生き残るがん細胞が存在するため、根治に至るのは稀である。分子標的薬による強力ながん細胞抑制下でなぜ tolerant 細胞が生き残るのか、そのメカニズムは不明であり、tolerant 細胞を標的とした治療法の開発にも至っていない。

SHP2 はがんの発生に深く関与するチロシンホスファターゼであり、様々な膜貫通型受容体からの刺激を、MAPK を含む種々のがん細胞内シグナルに伝達することが明らかにされている (Cell 2017, 170, 17-33.)。我々は肺癌治療における薬剤 tolerance に関わる因子として、この SHP2 に着目した。肺がん分子標的治療における SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果および SHP2 を介した drug tolerance 誘導メカニズムの解明を目的とした研究テーマを立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果を検証し、SHP2 による tolerant 細胞生存メカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

各遺伝子異常を有する肺がんとして以下の細胞株を用いた。ALK 融合遺伝子陽性肺がん; H3122、ABC-19。ROS1 融合遺伝子陽性肺がん; HCC78、ABC-20。EGFR 遺伝子変異陽性肺がん; PC-9、HCC827。また各遺伝子異常に対応した分子標的薬として下記の薬剤を用いた。ALK 阻害薬; alectinib。ROS1 阻害薬; crizotinib。EGFR 阻害薬; osimertinib。その他の薬剤として以下の薬剤を用いた。SHP2 阻害薬; SHP099。CDK4/6 阻害薬; palbociclib、abemaciclib。

#### 3-1. *in vitro*における SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果の検証

*in vitro*における SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果の検証するために、それぞれのがん細胞に遺伝子異常に応じた分子標的治療薬単独もしくは SHP099 併用下における細胞内シグナル抑制効果、細胞増殖抑制効果を検証した。細胞内シグナル抑制効果には immunoblotting 法を用いて評価を行い、細胞増殖抑制効果の検証に crystal violet assay および MTS assay を用いた。

#### 3-2. *in vivo*における SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果の検証

SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果を確かめるために、細胞株による皮下腫瘍モデルを作製し、SHP2 阻害薬 (SHP099) による残存腫瘍の抑制の程度を検証した。BALB/c nu/nu の皮下に各腫瘍細胞 (H3122, PC-9:  $2 \times 10^6$  細胞/腫瘍; ABC-20:  $4 \times 10^6$  細胞/腫瘍) を皮下に注射し、皮下腫瘍が約 200mm<sup>3</sup> に達した時点で、4 群に割付けて治療を開始した; 対照群・分子標的治療群 (ALK 肺がん; alectinib 10 mg/kg 週 5 回 経口投与、ROS1 肺がん; crizotinib 50 mg/kg 週 5 回 経口投与、EGFR 肺がん; osimertinib 5 mg/kg 週 5 回 経口投与)・SHP2 阻害薬群 (SHP099 50 mg/kg 週 5 回 経口投与)・併用群 (各分子標的薬 + SHP099)。腫瘍径およびマウスの体重を週に 2 回測定した。

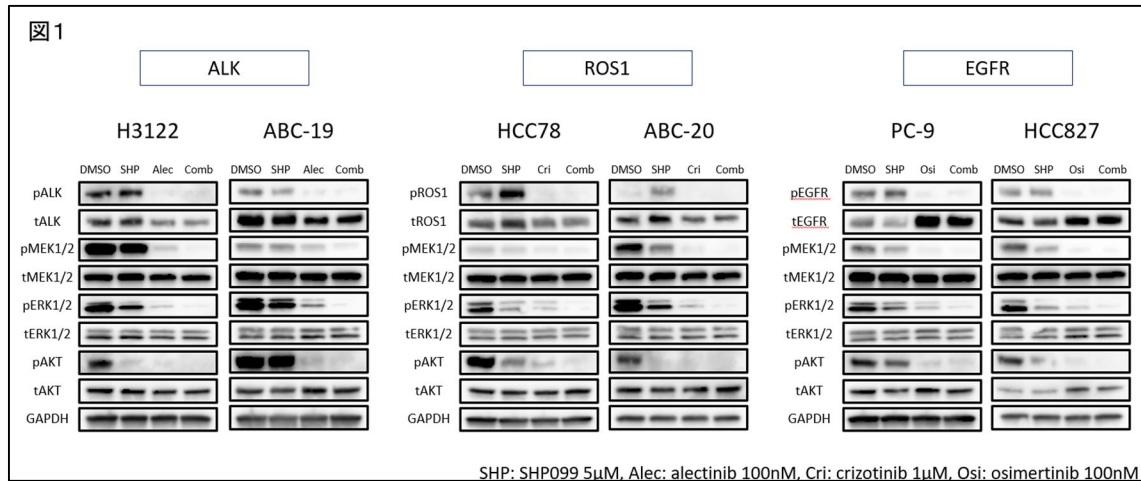
#### 3-3. SHP2 による tolerant 細胞生存メカニズムの解明

SHP2 による tolerant 細胞生存メカニズムを明らかにするためのモデルとして EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞モデルを用いた。既存の我々の検討では、EGFR 阻害薬による暴露下でも一部のがん細胞では細胞周期が完全には停止していないことが明らかとなっていたため、細胞周期関連蛋白である RB と SHP2 の関連性を検討した。EGFR シグナル阻害下における RB 活性状況を調べるために immunoblotting 法を用いて、RB のリン酸化状態を決定した。また、SHP2 シグナルが EGFR 阻害下の RB シグナルに及ぼす影響を決定するため、osimertinib 暴露下に SHP2 阻害薬である SHP099 もしくは SHP2 の下流 MEK の阻害薬である selumetinib を暴露することで RB の活性化が抑制されるかについて immunoblotting 法により検討を行った。さらに EGFR シグナル阻害下における RB による細胞周期維持が SHP2 による tolerance メカニズムに関与しているかどうかを明らかにするために、CDK4/6 阻害薬である palbociclib もしくは abemaciclib を用いて tolerance を予防できるかどうかについて crystal violet assay および皮下腫瘍マウスモデルにより検討した。皮下腫瘍モデルについては、3-2. *in vivo*における SHP2 阻害による tolerant 細胞抑制効果の検証における EGFR 肺がんモデルを用い、abemaciclib を 50 mg/kg 週 5 回 経口投与で投与した。

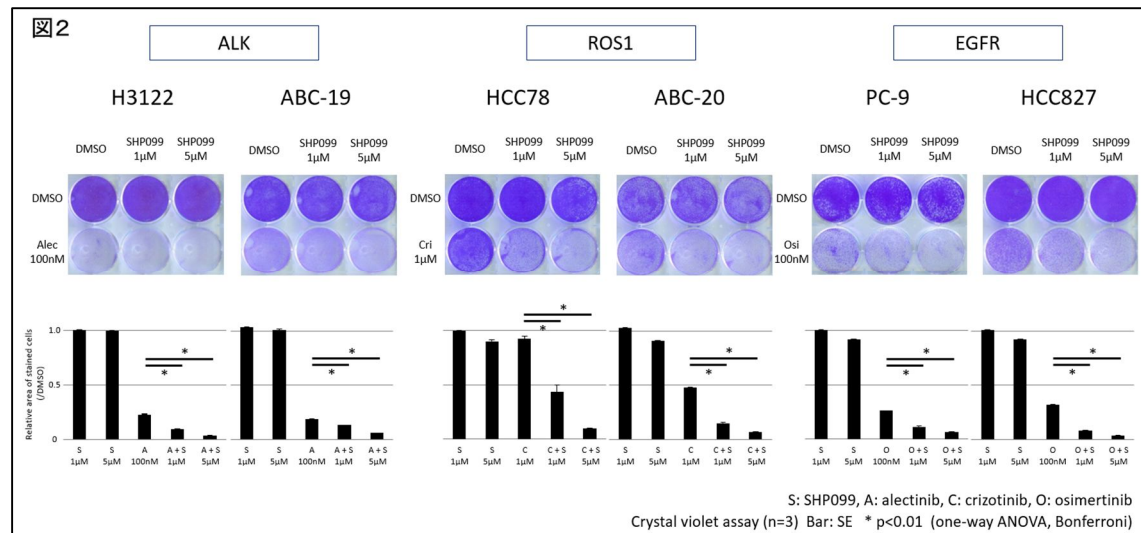
### 4. 研究成果

#### 4-1. SHP2 阻害薬は *in vitro*において各種分子標的治療薬に対する tolerant 細胞を阻害した

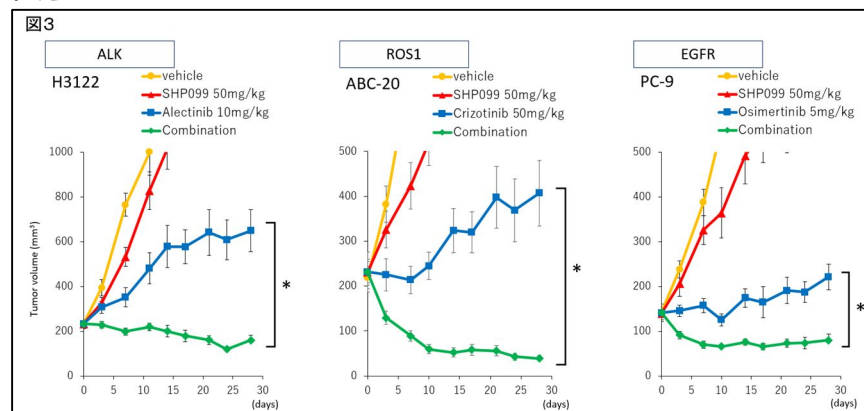
ALK 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子、EGFR 遺伝子変異を持つ肺がん細胞株を用い、それぞれに変異に応じたチロシンキナーゼ阻害薬（ALK 阻害薬：alectinib、ROS1 阻害薬；crizotinib、EGFR 阻害薬；osimertinib）で治療した場合、SHP2 阻害薬(SHP099)の併用の有無による細胞内生存・増殖シグナルの違いを免疫ブロッティング法により検討した（図1）。各種分子標的治療薬単独と比較し、SHP2 阻害薬を併用した場合、細胞内生存・増殖シグナルである ERK や AKT のリン酸化がより強力に抑制されていることが示された。



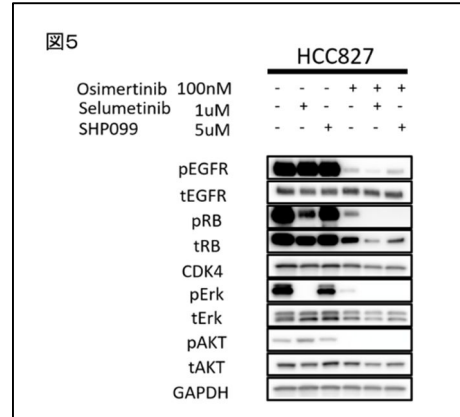
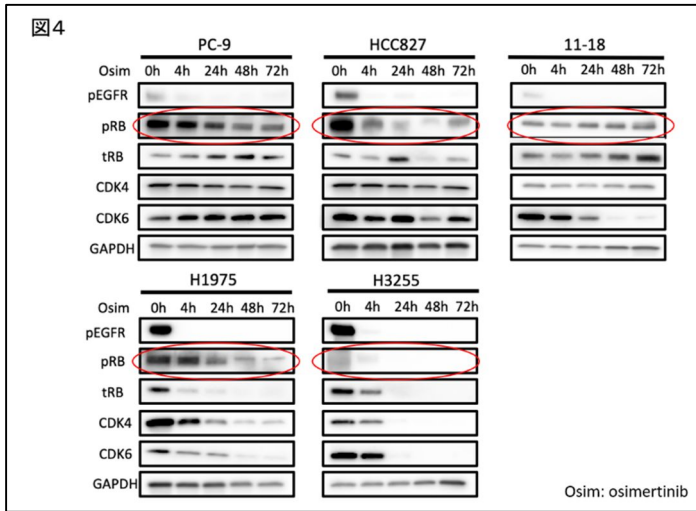
続いて SHP2 阻害薬の併用による細胞増殖抑制効果について検証した（図2）。Crystal violet assay（図2上段）および MTS assay（図2下段）を用いて細胞増殖抑制効果を検討したところ、各種分子標的治療薬単独と比較し SHP2 阻害薬を併用した場合、細胞増殖抑制効果が増強し、tolerant 細胞がほとんど出現していないことが示された。



4-2. SHP2 阻害薬は *in vivo* において各種分子標的治療薬に対する tolerant 細胞を阻害した  
 ALK 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子、EGFR 遺伝子変異を持つ肺がん細胞株を用いた皮下腫瘍モデルを作製し、*in vivo* における SHP2 阻害薬 SHP099 併用による腫瘍抑制効果についての検討を行った（図3）。各種分子標的治療薬に対し SHP2 阻害薬は抗腫瘍効果を有意に増強することが示された。



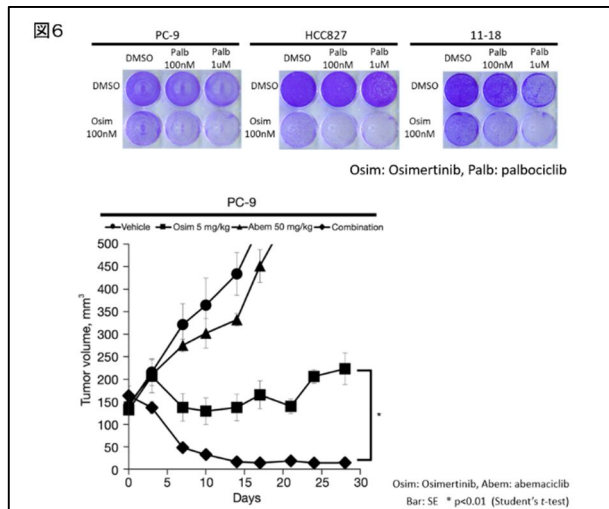
4-3. SHP2 は細胞周期調整たんぱくである Rb を介して分子標的阻害薬の tolerance を誘導する SHP2 による tolerant 細胞生存メカニズムを明らかにするためのモデルとして EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞モデルを用いて以後の研究を行った。EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞モデルにおいて EGFR 阻害薬 osimertinib 暴露下でも、細胞周期調整たんぱくである Rb の活性化が完全には抑制できていないことが明らかとなり (図 4) このことが SHP2 による tolerant 細胞生存メカニズムに関わるのではないかと仮説を立てた。SHP2 が osimertinib 暴露下に残存する RB 活性にどのように関与しているのかを調べるため、osimertinib と SHP2 阻害薬 SHP099 もしくは SHP2 の下流に存在する MEK の阻害薬である selumetinib を併用することにより、残存する RB 活性の変化を調べた (図 5)。SHP099 もしくは selumetinib 存在下では RB 活性は完全に抑制されることが明らかとなった。このことから selumetinib 存在下に残存する RB 活性は SHP2 のシグナルから由来するものであることが示された。



最後に、残存する RB 活性の抑制が EGFR 阻害薬 osimertinib の効果を増強し、tolerance 抑制作用があるかどうかを *in vitro* および *in vivo* において検討した。RB による細胞周期促進を阻害するため、CDK4/6 阻害薬である palbociclib もしくは abemaciclib を用いた (図 6)。

*In vitro* では、osimertinib 単独では一定割合のがん細胞が残存するのにに対し、CDK4/6 阻害薬 palbociclib を併用することで残存がん細胞が明らかに減少していた (図 6 上段)。また、*in vivo* の皮下腫瘍モデルでは osimertinib 単独では腫瘍の一部が残存するのにに対し、CDK4/6 阻害薬 abemaciclib を併用することで皮下腫瘍の消失を認めた (図 6 下段)。

以上の結果より SHP2 は細胞周期調整たんぱくである Rb を介して分子標的阻害薬の tolerance を誘導することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 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 無
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 Kano Hirohisa, Ichihara Eiki, Watanabe Hiromi, Nishii Kazuya, Ando Chihiro, Nakasuka Takamasa, Ninomiya Kiichiro, Kato Yuka, Kubo Toshio, Rai Kammei, Ohashi Kadoaki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 SHP2 Inhibition Enhances the Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Preclinical Models of Treatment-na?ve <i>ALK-,</i> ROS1-</i>, or <i>EGFR</i>-altered Non?small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1653 ~ 1662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-20-0965	査読の有無 無
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
研究 分 担 者	久保 寿夫  (Kubo Toshio)  (90726928)	岡山大学・大学病院・助教    (15301)	

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