様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 ２１ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１５５４６

研究課題名（和文）EGFR変異肺がんにおいて併存するRBM10遺伝子変異の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of coexisting RBM10 mutations in EGFR-mutated lung cancer

研究代表者
南條　成輝（Nanjo, Shigeki）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：００７２２５５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR変異肺癌患者でoncogeneであるEGFR変異のほかにco-mutationとしてRBM10遺伝子変異が7.6%で起こっており、RBM10をknock outすることでEGFR阻害薬によるアポトーシスが減弱することを明らかにした。さらにRBM10遺伝子変異共存症例でEGFR阻害薬のPFS、奏効率が有意に低いことも明らかにした。また、RBM10の欠損によりアポトーシス促進因子Bcl-xSのアポトーシス抵抗因子Bcl-xLへの比が低下することが明らかになった。そこで、Bcl-xL阻害薬をEGFR阻害薬に併用することで、初期耐性を克服できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
第3世代のEGFRチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）であるOsimertinibは、EGFR遺伝子変異陽性肺癌（EGFR肺癌)に対してよく奏効し、高い有効性を示す。しかしながら、当初から腫瘍が縮小しない、初期耐性も2-3割に認め、この原因解明と耐性克服が重要な課題であるが、申請者は本研究においてその機序と克服法を示した。
本研究において、肺癌の分子標的薬耐性の新たなメカニズムが同定されるとともに、治療法の候補が見つかったことから、近い将来耐性克服を目指す臨床試験が行われ、成果が患者に還元される可能性が生まれた。

研究成果の概要（英文）：In EGFR lung cancer patients, RBM10 mutation as a co-mutation occurred in 7.6% of patients in addition to oncogene EGFR mutation, and knockout of RBM10 attenuated apoptosis induced by EGFR inhibitors. We also found that PFS and response rate to EGFR inhibitors were significantly lower in patients with coexisting RBM10 mutations. In addition, the ratio of apoptosis-promoting factor Bcl-xS to apoptosis-resisting factor Bcl-xL was decreased by RBM10 deficiency. Then, we showed that the combination of a Bcl-xL inhibitor with an EGFR inhibitor can overcome this intrinsic resistance.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：分子標的薬耐性　RBM10遺伝子変異　EGFR変異肺癌　スプライシング因子

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

1. 研究開始当初の背景

肺がん分子標的治療は、EGFRなど薬物療法の標的となるoncoproteinを有する患者に対するEGFR阻害薬の開発などによって改善してきたが、根治や長期生存は未だに限定的であり、この根底には、腫瘍の不均一性があると考えられる。

本邦においては、がん遺伝子パネル検査が保険承認され、EGFR などの Oncogene の他にも様々な遺伝子に変異が起こることが明らかになり、EGFR 変異肺がんの約 8%において、mRNA スプライシング制御因子である RBM10 遺伝子にも変異が起こっており、そのほとんどが truncating 変異であることを見出した。我々の予備検討により、肺がん細胞における RBM10 の機能抑制は、EGFR 阻害薬へ治療耐性を誘導することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR を始めとする分子標的治療へのスプライシング制御因子を介した薬剤耐性機構を解明し、耐性を克服する新規治療法の開発を目的とする。

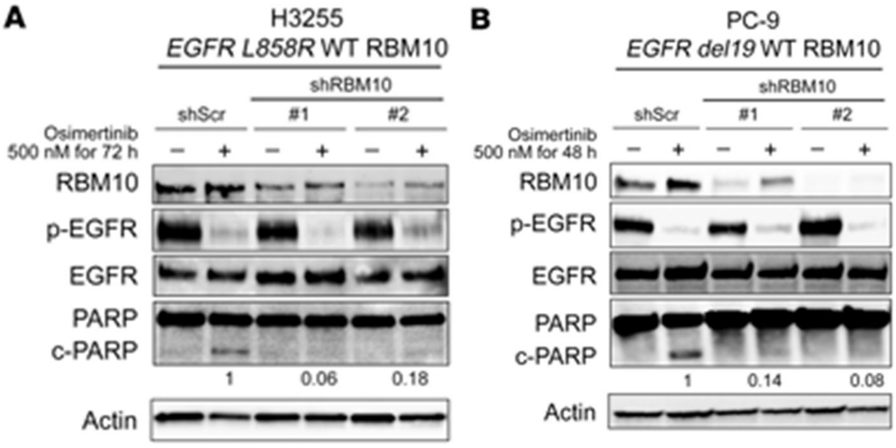
3. 研究の方法

患者由来の RBM10 変異が、上記の Bcl-x スプライシングの変化とアポトーシスの減少をもたらす機能喪失であるという仮説を検証する。具体的には、遺伝子工学的に患者由来の RBM10 変異を持つ cDNA コンストラクトを作成し、RBM10 欠損 A014 (EGFRL858R) 細胞上において再構成し、上記で検証された Bcl-xS と Bcl-xL に特異的な Q-RT-PCR プローブを使用して、その比率を定量化する。特に、RRM (RNA recognition motif) 、ZF (Zinc finger)、OCRE (OCtamer REpeat)、G-patch のドメインと、N,C 末端での変異について RBM10 野生型と比較する。なお、global analysis (Wang Y, et al. EMBO Mol Med. 2013)で報告された Bcl-x 以外の RBM10 のスプライシング標的因子への影響についても検討を行う。これらの研究で、Bcl-x などのスプライシングに必要な RBM10 の領域を明らかにする。また、 我々がデータを有する RBM10 変異症例における EGFR-TKI の効果を奏効率、PFS などで観察する。

4. 研究成果

申請者は、EGFR肺癌患者でoncogeneであるEGFR変異のほかにco-mutationとしてRBM10遺伝子変異が7.6%で起こっていることを示し、RBM10野生型のEGFR変異肺癌細胞株 (H3255株、PC-9株) でRBM10をknock outすることによりEGFR阻害薬 (Osimertinib) によるアポトーシスが減弱することをWestern blotでのcleaved PARPの減少で明らかにした (図1) 。

図1



また、逆にRBM10変異株ではRBM10のタンパク発現がなく、EGFR阻害薬の効果が低く、野生型RBM10を遺伝子導入して発現させることで効果が回復することを明らかにした。

さらに*EGFR*変異肺癌の臨床検体での*RBM10*変異の共存は、EGFR-TKIへの奏効率低下（野生型: 68% vs 変異型: 23%）とPFS短縮（野生型: 13.4か月 vs 変異型: 5.7か月）のバイオマーカーであった（図2）。

図2

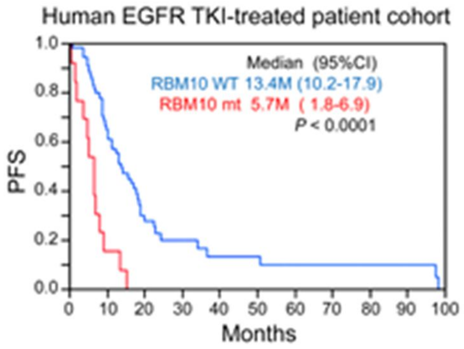
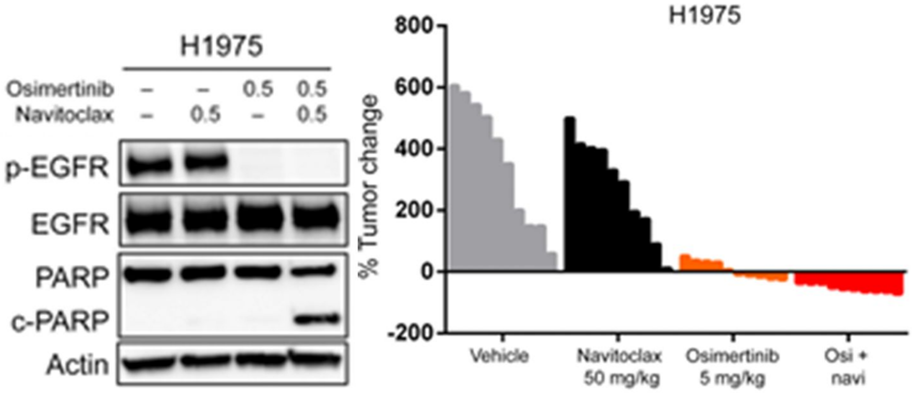


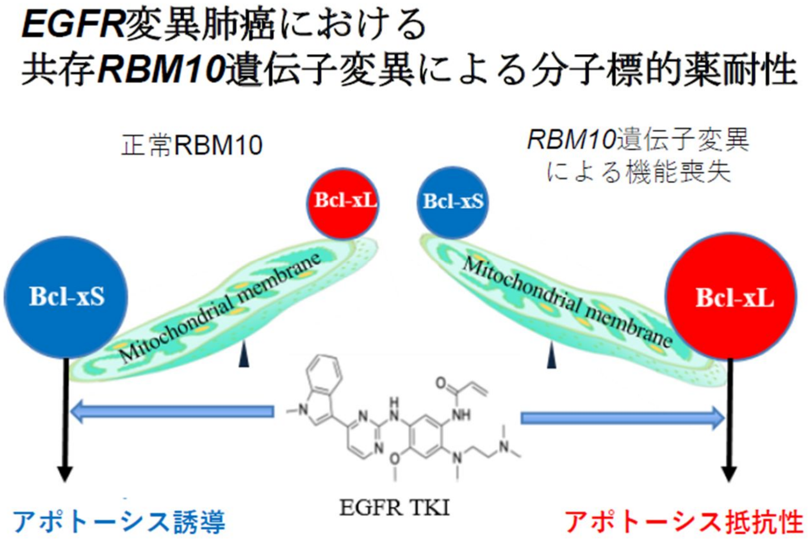
図3

また、RBM10はアポトーシス関連遺伝子Bcl-xのスプライシングを制御しており、RBM10の欠損によりアポトーシス促進因子Bcl-xSのアポトーシス抵抗因子Bcl-xLへの比が低下することが肺癌細胞株でのRBM10ノックダウン株との比較および、公的データベースでの解析で明らかになった（図3）。

図4



そこで、Bcl-xL阻害薬（Navitoclax）をEGFR阻害薬（Osimertinib）に併用することで、RBM10変異EGFR変異肺癌細胞株（H1975株）における初期耐性を克服できることをin vitro, in vivoで示した(図4)。



本研究において、肺癌の分子標的薬耐性の新たなメカニズムが同定されるとともに、治療法の候補が見つかったことから、近い将来耐性克服を目指す臨床試験が行われ、成果が患者に還元される可能性が生まれた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 OHTSUBO KOUSHIRO、MIYAKE KUNIO、ARAI SACHIKO、FUKUDA KOJI、SUZUKI CHIAKI、KOTANI HIROSHI、TANIMOTO AZUSA、NISHIYAMA AKIHIRO、NANJO SHIGEKI、YAMASHITA KANAME、TAKEUCHI SHINJI、YANO SEIJI	４．巻 2
２．論文標題 Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Plasma from Patients With Pancreaticobiliary Diseases	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Cancer Diagnosis Prognosis	６．最初と最後の頁 378～383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cdp.10120	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 Nanjo S, Wu W, Karachaliou N, Blakely C, Suzuki J, Chou Y, Ali S, Kerr L, Olivas V, Shue J, Rotow J, Mayekar M, Haderk F, Chatterjee N, Urisman A, Yeo J, Skanderup A, Tan A, Tam W, Arrieta O, Hosomichi K, Nishiyama A, Yano S, Kirichok Y, Tan D, Rosell R, Okimoto R, Bivona T.	４．巻 132
２．論文標題 Deficiency of the splicing factor RBM10 limits EGFR inhibitor response in EGFR-mutant lung cancer	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Clinical Investigation	６．最初と最後の頁 e145099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI145099	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 Zhang Bin、Liang Han、Liu Weiran、Zhou Xinlan、Qiao Sitan、Li Fuqiang、Tian Pengfei、Li Chenguang、Ma Yuchen、Zhang Hua、Zhang Zhenfa、Nanjo Shigeki、Russo Alessandro、Puig-Butille Joan Anton、Wu Kui、Wang Changli、Zhao Xin、Yue Dongsheng	４．巻 11
２．論文標題 A novel approach for the non-invasive diagnosis of pulmonary nodules using low-depth whole-genome sequencing of cell-free DNA	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Translational Lung Cancer Research	６．最初と最後の頁 2094～2110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr-22-647	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

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　2件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 南條成輝
2．発表標題 EGFR変異肺癌において併存するRBM10遺伝子変異によるEGFR-TKI耐性～なぜEGFR L858R変異に効きにくいのか～
3．学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4．発表年 2022年

1．発表者名 南條成輝
2．発表標題 EGFR 変異肺癌におけるRBM10遺伝子変異共存を通してみえてきた遺伝的な不均一性の克服 ～共存遺伝子による層別化と個別化治療～
3．学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4．発表年 2022年

1．発表者名 南條成輝
2．発表標題 Co-mutation in splicing factor with EGFR mutations limits sensitivity to EGFR-TKIs ～Why are EGFR-TKIs less effective against EGFR L858R?～
3．学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会（招待講演）
4．発表年 2022年

1．発表者名 南條成輝
2．発表標題 脳脊髄液腫瘍由来DNA(CSF-tDNA) を用いたEGFR変異肺がん中枢神経系転移における治療最適化
3．学会等名 第20回日本臨床腫瘍学会学術集会
4．発表年 2023年

１．発表者名
南條成輝

２．発表標題
転移性EGFR変異肺がんにおいて併存するRBM10遺伝子変異によるEGFR-TKI阻害薬耐性

３．学会等名
第30回日本がん転移学会学術集会・総会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shigeki Nanjo

２．発表標題
Co-mutation in splicing factor with EGFR mutations limits sensitivity to EGFR-TKIs ～Why are EGFR-TKIs less effective against EGFR L858R?～

３．学会等名
The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology（国際学会）

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shigeki Nanjo

２．発表標題
Deficiency of the splicing factor RBM10 limits EGFR inhibitor response in EGFR mutant lung cancer

３．学会等名
第62回日本肺癌学会学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shigeki Nanjo

２．発表標題
Deficiency of the splicing factor RBM10 limits EGFR inhibitor response in EGFR mutant lung cancer

３．学会等名
第19回日本臨床腫瘍学会学術集会

４．発表年
2022年

〔図書〕　計1件

1．著者名	4．発行年
南條成輝、矢野聖二	2022年
2．出版社 日本臨牀	5．総ページ数 6
3．書名 最新臨床肺癌学 日本臨牀 80巻増刊号8（通巻第1225号）	

〔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