

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15588

研究課題名（和文）肺がん分子標的治療の薬剤抵抗性に関わる新規コンパニオン診断法の開発

研究課題名（英文）Novel companion diagnostics of drug resistance to molecularly targeted therapy in lung cancer

研究代表者

吉村 彰紘（Yoshimura, Akihiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・研修員

研究者番号：10927221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：EGFR遺伝子変異陽性肺がんに対して、AXL高発現群は、AXL低発現群と比較してオシメルチニブの無増悪生存期間の有意な短縮を認めた。また、腫瘍内PD-L1発現をも組み合わせたAXLおよびPD-L1の高発現群は、他の群と比較して無増悪生存期間のさらなる短縮を認め、これらがオシメルチニブ治療におけるコンパニオン診断法として有用であることが期待される。細胞株実験において、AXLタンパク質の過剰発現がPD-L1の発現を促進し、オシメルチニブに対する不感受性を誘導することが示され、TCGAデータベースでは、肺腺がんコホートにおいて、AXL RNAレベルはPD-L1発現と正の相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮増殖因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGFR）遺伝子変異を有する肺がんに対し、オシメルチニブは有効な薬剤であるが、一部の症例で生じる治療早期から薬剤耐性は臨床的な課題の一つである。そこでAXLシグナル活性による治療抵抗性機構に着目し、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺がんにおいてもAXL分子が治療抵抗性に影響を及ぼすことを明らかにした。我が国でEGFR遺伝子変異陽性肺がん症例を対象とした初回併用治療に関する将来的な治験・臨床試験の実施が想定されるが、本研究結果は新規コンパニオン診断法として有用性があり、重要な研究成果につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We have uncovered the clinical impacts of tumor AXL expression levels in patients receiving osimertinib treatment for EGFR-mutated lung cancer. The high levels of AXL expression were associated with significantly shorter progression-free survival (PFS) with osimertinib than low levels of AXL expression. Our observations revealed that high AXL and PD-L1 expression levels in pretreatment tumors were predictors of poor PFS with osimertinib. Therefore, these research results are expected to be useful as a novel companion diagnostic method. A cell line-based assay demonstrated that AXL protein overexpression accelerated PD-L1 expression and induced insensitivity to osimertinib. In TCGA database, AXL RNA levels were positively correlated with PD-L1 expression in a lung adenocarcinoma cohort.

研究分野：トランスレーション研究

キーワード：コンパニオン診断法 肺がん 分子標的薬治療 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

肺癌における分子標的薬の登場による影響

肺癌は世界で最も死亡者数の多い癌種であるが、近年の分子標的治療の発展により、がんの増殖や生存に寄与する様々なドライバー遺伝子異常が発見された。日本の肺腺がん患者のおよそ半数と、最も高頻度に検出されるドライバー遺伝子異常は上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異であるが、その阻害剤である EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) が本邦で上市された後は上市前と比較して肺腺がん全体の生存曲線をシフトさせるほどのインパクトを示し (J Clin Oncol. 2008;26:5589-95.)。現在では EGFR をはじめ、ドライバー遺伝子異常を有する肺癌には、有効性が確認された分子標的薬で治療を行うことが標準治療とされている。なお、本邦を含む東アジアでは欧米と比較してドライバー遺伝子変異を有している非小細胞肺癌が多いと報告されており、現在、本邦を中心に多種多様なエビデンスが構築されている。

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI の効果とその限界

EGFR は膜通貫型受容体チロシンキナーゼであり、それに特異的なリガンド結合によってリン酸化し活性化することで、がん細胞は恒常的に増殖および進展する。EGFR-TKI はこのチロシンキナーゼの ATP 結合部位と競合的に結合することで EGFR のリン酸化を阻害し、がん細胞の増殖を抑制する。現在までに本邦では EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対して 5 つの EGFR-TKI が承認されている。第一/二世世代の EGFR-TKI でも奏効率は 60-80%、無増悪生存期間の中央値は 9~14 ヶ月と良好な治療効果を示すが、第三世代の EGFR-TKI であるオシメルチニブは第一世代の EGFR-TKI と比較して有意な無増悪生存期間の延長を認め、現在の日常診療では EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対する一次治療としてオシメルチニブが標準的に用いられるようになっている。オシメルチニブは高い治療効果を発揮するものの、それでもその効果は一時的であり、最終的には、ほぼすべての患者で耐性をきたす。中でも、オシメルチニブに早期に薬剤耐性を示す症例を診断することは重要な課題である。治療開始後に出現する薬剤耐性は治療の最大の障壁であり、治療後の腫瘍増大・進行は、がんの不均一性 (Heterogeneity) を助長し、難治化に寄与する。それゆえ、治療抵抗性を示す症例の早期診断とその対策はさらなる肺癌治療の発展においては極めて重要な課題である。

AXL の発見

AXL は、慢性骨髄性白血病患者から単離された、TAM 受容体ファミリーに属するチロシンキナーゼ受容体のひとつである。Gas6 というタンパク質が結合する受容体タンパク質で、細胞膜に存在する。骨髄細胞・間質にも発現しているが、がん細胞では過剰に発現し増殖や転移などの関与が知られている。さらに、がん領域における免疫寛容の促進や薬剤耐性への関与も認められている。複数のがん種、腫瘍内の AXL タンパク発現は予後不良因子と報告されている。

AXL シグナルと治療抵抗性細胞との関連

近年、がん治療薬に対して初期抵抗性を示す、いわゆる「薬剤抵抗性細胞」の存在が注目されている。抵抗性細胞は薬剤曝露による細胞死誘導を回避するための逃避機構を有することで薬剤感受性低下効果を示す。我々は、*in vitro* でオシメルチニブ治療により AXL シグナルを介した negative feedback 機構が誘導され、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞の生存シグナル維持に寄与することを見出した。AXL 高発現 EGFR 肺癌細胞に対する AXL 阻害はオシメルチニブの治療効果を増強し治療抵抗性細胞の生存を抑制した。さらに、臨床検体を用いた後方視的解析で、AXL 高発現を有する EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者は、第一/二世世代 EGFR-TKI による治療効果 (無増悪生存期間、最良総合効果など) は乏しいことを明らかにした (Nat Commun. 2019;10:259.)。

2. 研究の目的

本研究では肺癌の初回治療導入時に生じる AXL シグナル活性による治療抵抗性に着目し、そのコンパニオン診断法の開発を通じて、将来的な治験・臨床試験の基盤として発展させることを目的とする。我が国で EGFR 変異肺癌症例を対象とした初回併用治療に関する将来的な治験・臨床試験の実施を想定し、新規コンパニオン診断法としての有用性を検証することで、将来的に有望な EGFR 変異肺癌に対する新規治療において、症例選択が可能となるため、重要な研究成果につながることを期待される。

また、近年、腫瘍内 AXL 発現と腫瘍内 Programmed death-ligand 1 (PD-L1) 発現に関して有意な相関があることが報告されており (Clin Cancer Res. 2021; clincanres.0972.2021.) EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌においても関連がある可能性がある。AXL シグナル活性と腫瘍内 PD-L1 発現との関連を検討することで、より精度の高いコンパニオン診断法の開発に役立つと考えている。

3. 研究の方法

京都府立医科大学附属病院および共同研究機関である京都第一赤十字病院、京都第二赤十字病院、地方独立行政法人市立大津市民病院、宇治徳洲会病院、市立福知山市民病院、新潟大学医歯学総合病院、長崎大学病院、金沢大学附属病院、静岡がんセンター、がん・感染症センター東京都立駒込病院、順天堂大学病院、藤田医科大学病院の各施設の倫理委員会にて本前向き観察研究の承認を受け、初回治療としてオシメルチニブを開始予定で、本研究への参加の同意が得られた進行期・術後再発の EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者 100 例の登録を 2018 年 9 月から開始する。

各々の患者の治療開始前に採取した腫瘍検体を用いて腫瘍組織内の AXL および関連タンパクの発現や EGFR 遺伝子変異について免疫染色法および PCR 法を用いて評価し、収集した患者の年齢や性別などの臨床情報や治療効果(無増悪生存期間、最良総合効果)との関連について解析する。また、予後および効果予測因子としての AXL および関連タンパクの発現の有用性についても解析を行う。また、AXL および関連タンパクの発現と腫瘍内 PD-L1 発現との関連については、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の臨床情報の評価も行い、より精度の高いコンパニオン診断法の確立を目指す。

さらに、*in vitro* でも AXL および関連タンパクの発現と腫瘍内 PD-L1 発現との関連を評価するために、EGFR 遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞を用いて、ウイルスベクターを用いた AXL 遺伝子導入などにより AXL および関連タンパクの発現を変化させることによってオシメルチニブの感受性の変化や PD-L1 発現の変化を確認し、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるオシメルチニブへの治療抵抗性のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

腫瘍内 AXL 発現に関しては染色性の程度によって、0 から 3+ に分類し、0、1+、2+ を AXL 低発現群、3+ を AXL 高発現群と定義した。AXL 高発現群の割合は 26.1% と既報と概ね合致し、診断時の生検部位や解析方法などを含め、臨床病理学的特徴において AXL 高発現群と AXL 低発現群の両群間に有意差を認めなかった。すべての患者におけるオシメルチニブ治療の奏効率は 78.4% で既報に遜色ない結果であった。AXL 高発現群の奏効率は AXL 低発現群の奏効率と比較してやや低値であり(66.7% 対 82.8%, $p = 0.145$)、有意差は認めなかったものの AXL 高発現群ではオシメルチニブ治療の効果の減弱を認めた。すべての患者におけるオシメルチニブ治療の無増悪生存期間の中央値は 17.4 カ月であった。AXL 高発現群は AXL 低発現群と比較して有意に無増悪生存期間の短縮を認めた(8.9 カ月対 21.5 カ月, $p = 0.026$)。この結果より、治療前の腫瘍における AXL タンパク発現はオシメルチニブ治療の効果予測に有用であった。

腫瘍内 PD-L1 発現と AXL タンパク発現との関連の検討において、腫瘍内 PD-L1 発現が高い患者の割合は AXL 低発現群と比較して AXL 高発現群において有意に高く(9.1% 対 45.0%, $p = 0.002$)。また、TCGA データベースを用いた解析においても、肺腺がん患者において AXL mRNA 発現は CD274 (PD-L1) と正の相関を認めた($r = 0.4701$, $p < 0.0001$)。さらに腫瘍内 AXL および PD-L1 発現の組み合わせた検討で AXL 高発現かつ PD-L1 高発現群は他の群と比較して無増悪生存期間の短縮を認めた。この結果より、AXL タンパク発現に加えて、腫瘍内 PD-L1 発現を組み合わせることで、より精度の高いオシメルチニブ治療に関する効果予測を行うことができた。

EGFR の Exon19 欠失変異および Exon21 点突然変異(L858R)を有するそれぞれの Ba/F3 細胞に対して、AXL 遺伝子導入による AXL の過剰発現によって、MTT assay 法を用いてオシメルチニブに対する感受性の低下が認められた。また、AXL の過剰発現によって、それぞれの Ba/F3 細胞において、転写因子 cMyc と PD-L1 の発現レベルの上昇をともに認めた。両遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞において、オシメルチニブの投与は cMyc と PD-L1 の発現にほとんど影響を与えず、それぞれの si-RNA を用いたノックダウンの検討により AXL が cMyc-PD-L1 経路の活性化を制御することが明らかになった。

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌において AXL シグナル活性と腫瘍内 PD-L1 発現との関連を検討することで、オシメルチニブの効果予測に関する精度の高いコンパニオン診断法の開発に役立つ可能性があることが示唆された。また、今回の検討により、cMyc の関与も明らかになったため、cMyc も組み合わせることで今後さらなるより良いコンパニオン診断法の開発に寄与する可能性がある。

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 Yoshimura A, Yamada T, Serizawa M, Uehara H, Tanimura K, Okuma Y, Fukuda A, Watanabe S, Nishioka N, Takeda T, Chihara Y, Takemoto S, Harada T, Hiranuma O, Shirai Y, Shukuya T, Nishiyama A, Goto Y, Shiotsu S, Kunimasa K, Morimoto K, Katayama Y, Suda K, Mitsudomi T, Yano S, Kenmotsu H, Takahashi T, Takayama K | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 High levels of <i>AXL</i> expression in untreated <i>EGFR</i> mutated non small cell lung cancer negatively impacts the use of osimertinib | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 606～618 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15608 | 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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| | |
|--|--|
| 1. 発表者名 山田忠明 | |
| 2. 発表標題 AXLを標的としたEGFR遺伝子変異肺がんの初期併用治療法の臨床開発に向けた取り組み | |
| 3. 学会等名 第64回日本肺癌学会総会 | |
| 4. 発表年 2023年 | |
| 1. 発表者名 吉村彰紘 | |
| 2. 発表標題 未治療EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺がんを対象としたオシメルチニブ治療効果と腫瘍内AXL発現に関する検討 | |
| 3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会 | |
| 4. 発表年 2022年 | |
| 1. 発表者名 山田忠明 | |
| 2. 発表標題 EGFR遺伝子変異肺がんの初回オシメルチニブ治療における腫瘍内AXL高発現の意義 | |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会 | |
| 4. 発表年 2022年 | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|