

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05431

研究課題名(和文) 遺伝子発現と変異プロファイル解析に基づくEGFR変異肺癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy based on gene expression and mutation profiles in EGFR mutant lung cancer

研究代表者

豊岡 伸一 (Toyooka, Shinichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30397880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異肺癌治療において、獲得耐性機序を治療前に予測すると同時にその耐性出現を防ぐ初期治療の確立を目指す研究を行った。高感度の検出が可能である分子バーコードを用いたDeepシーケンシングにより、肺癌臨床検体で高率に複数のEGFR変異の共存が確認された。オシメルチニブに対する耐性を獲得した細胞株の検討では、EMT化による耐性獲得細胞では、高率にAXLが高発現し、AXL阻害剤であるカボザンチニブの上乗せにより耐性が解除されることを明らかにした。またドラッグリポジショニング解析から抗生物質モノニンが抗EMT化作用を示し、その耐性獲得を抑制が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌治療は、分子標的治療の導入により大いに前進したが、一方で現時点では耐性化は不可避でありこれを防ぐ手立てはない。本研究の成果は、治療前から出現する可能性のある耐性機序を予測し、耐性化を阻止する「先制治療」の確立につながる重要な知見である。特にEGFR-TKIのみならず各種抗癌剤に対する耐性機序としても重要なEMT化の阻止は、肺癌薬物治療全体に大きなインパクトを及ぼすことが期待される。そのため、本研究は全肺癌治療成績の大幅な改善に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed the research to develop new therapeutic strategy in EGFR mutant non-small cell lung cancer; prediction about an acquired resistance mechanism to EGFR-TKI and selecting a preventative therapy against emergence of resistance. Targeted deep sequencing with the molecular barcoding system showed a high incidence of coexistence of EGFR common driver mutations and uncommon mutations. In cellular models, AXL was often upregulated in EMT mediated osimertinib resistant cell lines, and addition of cabozantinib, an AXL inhibitor, restored the sensitivity to osimertinib. Drug repositioning analysis revealed that monensin have an preventative effect against EMT, and also EMT-mediated acquired resistance.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 分子標的薬 分子バーコード 次世代シーケンサー 薬剤耐性 EMT PDX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌における上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の優れた効果が示されているが、一方で耐性獲得による治療抵抗性が大きな問題となっている。代表的耐性機構として T790M 変異に代表される耐性変異が挙げられ、これらは治療前より内在する超マイナークローンが治療選択的に増殖する可能性が示唆されている。そして T790M 変異には三代 EGFR-TKI、その他のマイナー変異にも各世代の EGFR-TKI がそれぞれ有効であることから、変異型別の EGFR-TKI の使い分けによる治療最適化の可能性が示唆されている。一方でその他の耐性機構として、がん細胞の上皮間葉系移行 (EMT 化) による耐性の獲得が報告されているが、これに対する確立された有効な薬剤は現時点では報告されていない (図 1)。

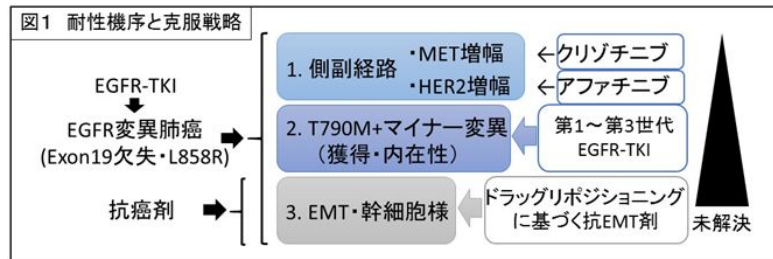


図 1. EGFR-TKI耐性機序と克服戦略

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子発現と変異プロファイル解析に基づく EGFR 変異肺癌に対する新しい治療法の開発である。申請者らは、EGFR-TKI に対する耐性化の機構のうち、EMT 化と薬剤耐性 EGFR マイナー変異の出現を治療前に予測できる可能性に着目し、EMT 化の制御を可能とする薬剤候補の併用療法、あるいは EGFR マイナー変異それぞれに各種 EGFR-TKI の感受性が異なることから、治療前予測に基づいた適切な初期治療薬剤を選択することにより、EGFR 変異肺癌に対して耐性出現を許さない「次世代の治療法」の確立・実証を目的とした。

3. 研究の方法

分子バーコードを用いたウルトラ Deep シークエンス手法の開発

分子バーコードを用いたウルトラ Deep シークエンス手法により、0.1%を下回る超マイナー変異の高感度検出系を確立し、肺癌細胞株を用いた希釈系列により検出感度を決定する。さらに肺癌臨床検体を用いてマイナー変異を含めた EGFR 変異スペクトルを解析する。

既存の細胞株の発現プロファイル解析

EGFR-TKI 暴露による耐性化で EMT 化する細胞の発現解析を行い、EMT 化予測アルゴリズムを確立する。

ドラッグリポジショニング解析により同定された抗 EMT 化作用を有する薬剤の評価

ドラッグリポジショニング手法を用いて同定された、EMT 化による耐性獲得機構の阻害作用を有することが示唆される薬剤を in vitro で EMT 化抑制作用を評価する。

切除標本のゲノム解析による EGFR 変異状態と発現

プロファイル解析による EMT 化評価により耐性を獲得しやすい切除検体を決定し PDC・PDX モデルを作製する。EGFR-TKI + EMT 化抑制薬剤の On/Off 治療を実施し、併用療法の有効性と今後の課題を検討する。

4. 研究成果

分子バーコードを用いたウルトラ Deep シークエンス手法の開発

EGFR 遺伝子変異を有する原発性肺癌手術症例から得られた新鮮凍結組織より gDNA を抽出し、分子バーコードを使用したシークエンスと使用しないものとを比較検討し、分子バーコードにより PCR エラーを除去し再現性のあるデータを得られることを確認した。このようにエラーを判別・除去することで 0.5%程度の変異まで正確に検出可能となった。(図 2)

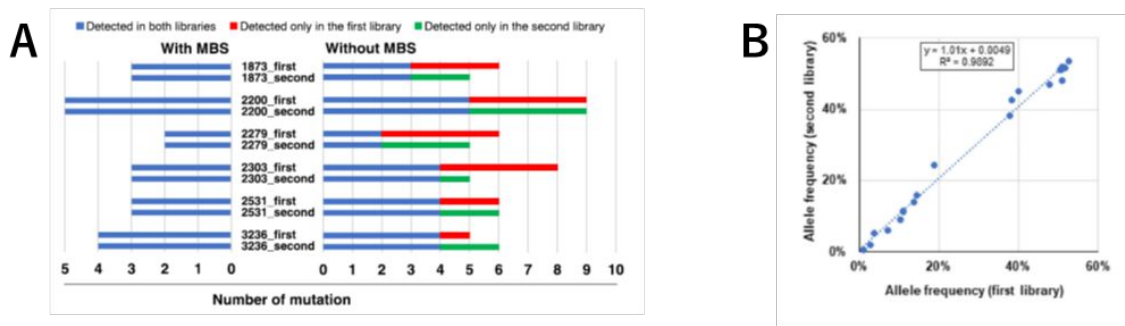


図2. 分子バーコードを用いたDeepシーケンス

分子バーコードの有無によるシーケンスデータの再現性を比較したところ、分子バーコードを用いた手法の再現性の優越性が示された (A,B)。

既存の細胞株の発現プロファイル解析

様々な EGFR チロシンキナーゼ (EGFR-TKI) 耐性細胞株を樹立し、発現プロファイル解析を行った。その中で、AXL 高発現細胞では高頻度に EMT 化を来し、オシメルチニブに耐性を示していた。そこで上皮間葉移行 (EMT) 化に関連する耐性克服の新たなバイオマーカー候補として AXL に着目し、AXL 阻害剤カボザンチニブの効果を単剤および従来の分子標的薬との併用実験 (in vitro およびマウスモデル) を行ったところ、カボザンチニブの併用により耐性が解除されることが明らかになった (図 3)。

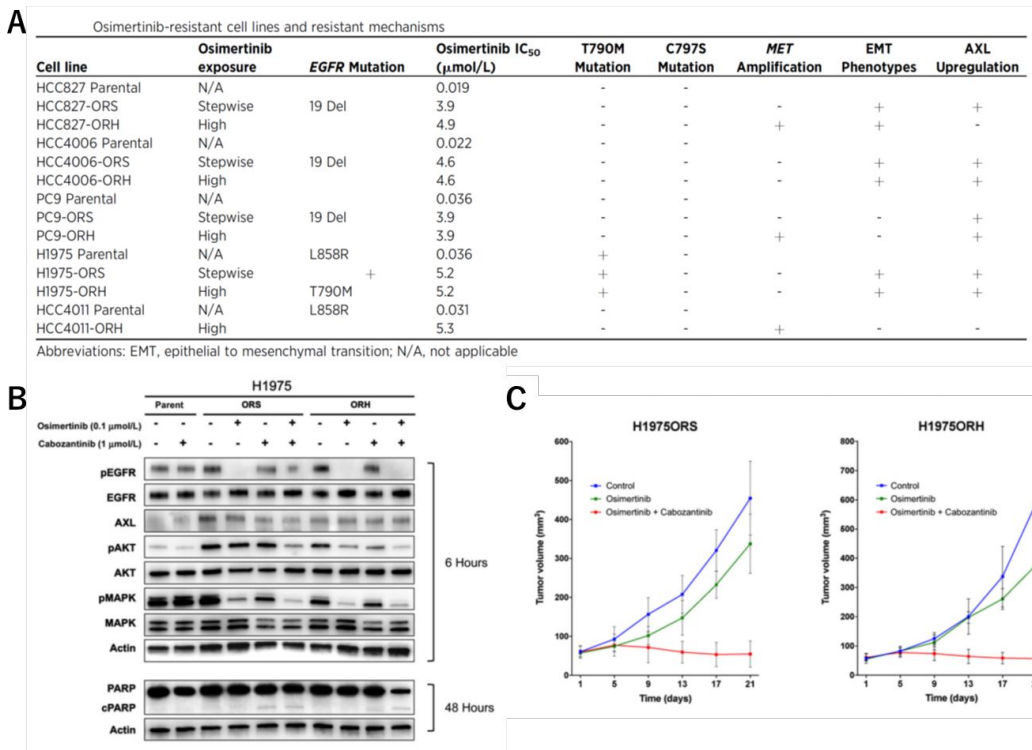


図3. オシメルチニブ耐性株の分子変異・発現プロファイル解析 オシメルチニブ耐性株を樹立し、分子変異・発現プロファイル解析を行ったところ、EMT獲得細胞は効率にAXLの高発現を認めた (A)。H1975オシメルチニブ耐性株において、AXL阻害剤であるカボザンチニブを併用による耐性解除をin vitroおよびin vivoで明らかにした (B, C)。

ドラッグリポジショニング解析により同定された抗 EMT 化作用を有する薬剤の評価

EMT に注目したドラッグリポジショニング解析を行い、同定された薬剤の抗 EMT 化作用を in vitro で検討した。TGF- 投与による EMT 誘導モデルを用いて、抗 EMT 化薬剤 (候補) の EMT 化抑制効果の評価を行ったところ、ポリエーテル系抗生物質であるモネンシンの抗 EMT 化作用が明らかになった。さらにモネンシン投与により、EMT に伴う EGFR-TKI に対する耐性獲得を抑制が可能であることを明らかにした (図 3)。

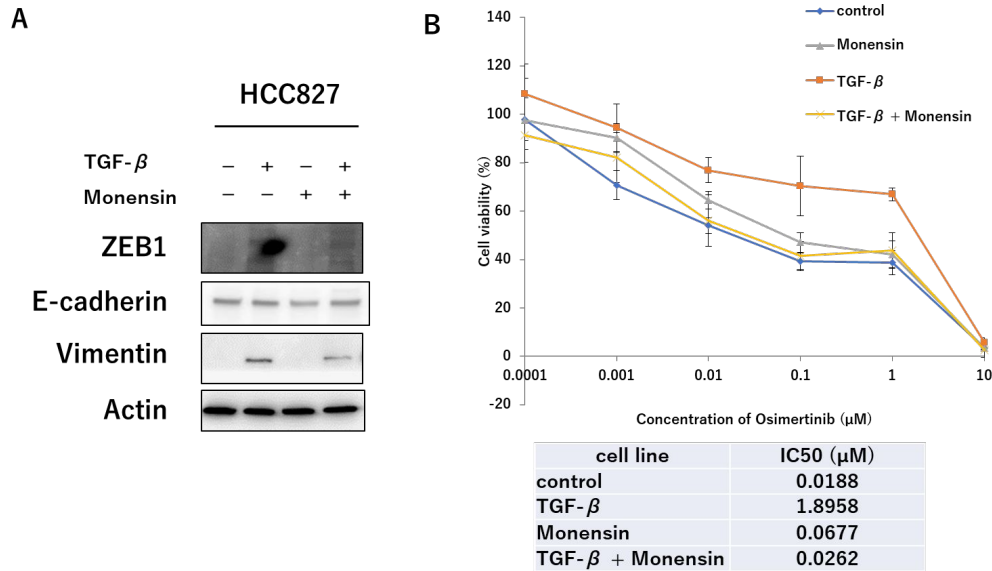


図4. モネンシンによる抗EMT化作用および耐性獲得抑制効果 TGF- β によるEMT誘導モデルを用いて、抗EMT化作用を検討したところ、モネンシンによるEMT化抑制効果を認めた (A)。さらにモネンシンを併用することによりEMT化に伴う薬剤耐性獲得の予防効果を示した (B)。

切除標本のゲノム解析による EGFR 変異状態と発現

原発性肺癌手術検体 64 サンプルに対して、分子バーコードを用いた Deep シークエンスにより解析したところ、10.9%のEGFR変異肺癌でEGFRメジャードライバー変異のほか複数のEGFR変異 (Compound mutation) を認め、特にEGFR G719Xにおいて併存する頻度が高いことを明らかにした (図5)。

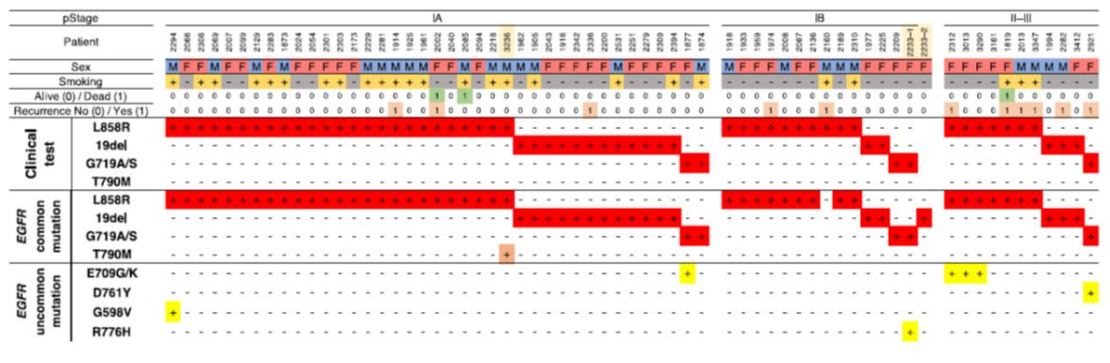


図5. EGFR変異を有する肺癌組織の分子バーコードを用いたシーケンス結果 分子バーコード手法を用いて64サンプルのdeepシーケンスを行ったところ、10.9%のEGFR変異肺癌で複数のEGFR変異 (Compound mutation) を認めた。

PDC・PDXモデルについては、当初プロファイル解析によるEMT化を獲得しやすい切除検体を抽出し肺癌臨床検体を用いたPDC・PDXモデルの作製を予定していたが、期待していたPDXモデルの樹立は得られなかった。一方で、マウス内において高頻度に転移を示す臨床検体を同定し、その細胞株化に成功した。さらにこのモデルを用いて転移および薬剤耐性に関わる候補因子を同定した。今後引き続き、この候補因子に関する機能解析を行うとともに、これらを阻害する効果を有する薬剤の検索を行い、今後得られた結果を報告する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Kei Namba, Shinichi Toyooka (他 11 名), Activation of AXL as a Preclinical Acquired Resistance Mechanism Against Osimertinib Treatment in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cells, *Mol Cancer Res*, 査読有, 2019 Feb;17(2):499-507. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0628.

Kei Namba, Shinichi Toyooka (他 13 名), Application of amplicon-based targeted sequencing with the molecular barcoding system to detect uncommon minor EGFR mutations in patients with treatment-naïve lung adenocarcinoma, *BMC Cancer*, 査読有, 2019 Feb 26;19(1):175. doi: 10.1186/s12885-019-5374-1.

〔学会発表〕(計 5 件)

Kei Namba, Shinichi Toyooka(他 8 名), Activation of AXL as a preclinical acquired resistance mechanism against osimertinib treatment in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells, AACR Annual Meeting 2019, 2019 年、Atlanta, USA

Kei Namba, Shinichi Toyooka(他 7 名), Detection of multiple low-frequency mutations by molecular-barcode sequencing, 第 76 回日本肺癌学会学術総会 (横浜), 2017 年

Kei Namba, Shinichi Toyooka(他 6 名), Multiple acquired resistance mechanisms against third generation EGFR-TKI osimertinib in non-small cell lung cancer cells, 第 58 回日本肺癌学会学術集会 (横浜), 2017 年

Kei Namba, Shinichi Toyooka(他 8 名), Detection of multiple low-frequency mutations by molecular-barcode sequencing, IASLC 17TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER, 2016 年, Vienna, Austria

Kei Namba, Shinichi Toyooka(他 8 名), Detection of multiple low-frequency mutations by molecular-barcode sequencing, 第 57 回日本肺癌学会総会 (福岡), 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三好 新一朗

ローマ字氏名：(MIYOSHI, Shinichiro)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：特命教授

研究者番号 (8 桁): 00190827

研究分担者氏名：富田 秀太
ローマ字氏名：(TOMIDA, Shuta)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：10372111

研究分担者氏名：枝園 和彦
ローマ字氏名：(SHIEN, Kazuhiko)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号(8桁)：30708079

研究分担者氏名：山本 寛斉
ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Hiromasa)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号(8桁)：40467733

研究分担者氏名：阪口 政清
ローマ字氏名：(SAKAGUCHI, Masakiyo)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：70379840

研究分担者氏名：宗 淳一
ローマ字氏名：(SOH, Junichi)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号(8桁)：90559890

(2)研究協力者
なし

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、研究者個人に帰属されます。