

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19454

研究課題名(和文) 肺癌の治癒を目指すEGFR-TKI、抗EGFR抗体とベバシズマブ併用療法の効果

研究課題名(英文) In vivo efficacy of triplet therapy with osimertinib, cetuximab and bevacizumab for lung cancer cells harboring EGFR T790M

研究代表者

大橋 圭明(Ohashi, Kadoaki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：60729193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：第3世代EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)はEGFR T790M変異を有する肺癌における標準治療であるが、耐性化するため新規治療戦略が必要である。本研究では、オシメルチニブ、抗EGFR抗体セツキシマブと血管新生阻害薬ベバシズマブの3剤併用療法の効果を検討した。マウスモデルにて、低腫瘍量のゼノグラフトでは3剤併用療法の優越性は示されなかったが、腫瘍が進展した高腫瘍量のゼノグラフトでは3剤併用療法は、単剤、2剤併用療法に対してより強い抗腫瘍効果を示した。臨床試験で検討する価値のある有望な治療方法と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子に変異が起こることで肺癌が発症する。EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)が標準治療であるが、いずれ耐性化して根治は期待できない。本研究では第3世代EGFR-TKIであるオシメルチニブと抗EGFR抗体であるセツキシマブにてがんの原因であるEGFRをより強力に阻害し、さらに血管新生阻害薬ベバシズマブを上乗せする3剤併用療法の効果を基礎的に検討した。この新規3剤併用療法により、単剤治療と比べて強い腫瘍抑制効果が確認できたため、臨床試験で有効性をさらに検討すべき有望な治療法と考える。

研究成果の概要(英文)：Osimertinib, a third-generation epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI), is the standard treatment for patients with lung cancer harboring EGFR T790M. However, acquired resistance to osimertinib is inevitable, and alternative strategies are needed. We hypothesized that the combination of osimertinib with cetuximab and/or bevacizumab is a more effective treatment than osimertinib monotherapy for lung tumors harboring EGFR T790M. In the xenograft model, the triplet therapy showed no superior effect than doublet therapies (osimertinib plus bevacizumab or osimertinib plus cetuximab) in xenograft model with small tumors. However, the triplet therapy had stronger antitumor effects than osimertinib monotherapy or doublet therapies in xenograft model with larger tumors. The triplet therapy may have an advantage in advanced lung cancer with high tumor volume.

研究分野：呼吸器悪性腫瘍

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR変異 オシメルチニブ セツキシマブ ベバシズマブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において発癌の直接的な原因となる癌特有の分子異常(**driver mutations**)が同定され、病理組織分類に加えて治療方針に直結する **driver mutations** による分類が重要になっている。肺癌では、**2004** 年に上皮成長因子受容体 (**EGFR**) 遺伝子変異が発見され、**EGFR**-チロシンキナーゼ阻害薬 (**TKI**) であるゲフィチニブやエルロチニブの臨床効果と相関することがわかった。前臨床モデルで **EGFR** 遺伝子変異による持続的な **EGFR** の活性化が肺癌の発生につながることを **in vitro, in vivo** で示された。申請者らも、**EGFR** 変異遺伝子をマウス肺の **2** 型肺胞上皮特異的に発現させる遺伝子改変マウスを作製し、**EGFR** シグナルに依存して発生、進展する肺癌の発生を確認し (**Ohashi et al Cancer Sci 2008, Ohashi et al Cancer Res 2009**)、国内特許を取得した。

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する **EGFR-TKI** の奏効率は **70~80%** と非常に高く、**EGFR-TKI** は第一選択薬となった。しかしながら **EGFR** 遺伝子変異を有する進行肺癌患者に **EGFR-TKI** を用いて治療を行った場合、平均生存期間は **4-5** 年程度である。**EGFR-TKI** が一旦奏効した肺癌のほぼ全例が再増悪をきたすこと (獲得耐性) が临床上の非常に大きな問題である。獲得耐性の原因として最も頻度が高いのは、二次性の **EGFR** 遺伝子変異 (**exon20 T790M**) の出現であり、原因の **50~60%** を占める (**Ohashi J Clin Oncol 2013**)。 **EGFR T790M** に活性がある第 **3** 世代 **EGFR-TKI** が認可され標準的に使用されるようになったが、残念ながら耐性化は同様に避けられない。

その他の臨床開発中の治療法の **1** つに、**EGFR T790M** に活性がある **EGFR-TKI** のアファチニブと抗 **EGFR** 抗体であるセツキシマブの併用療法がある。第 **1/2** 相臨床試験で奏効率 **40%**、腫瘍制御率 **90%** と **EGFR T790M** に対し、良好な効果が示された (**Janjigian et al Cancer Discov 2014**)。これに基づき現在第 **3** 相試験が進行中であるが、第 **1/2** 相試験において、正常組織に発現する **EGFR** の阻害が原因と思われる皮疹や下痢などの毒性が強く出現し、約 **20%** の患者が治療中止されている点と、効果が **5** か月程度しか持続しない点から改善の余地がまだある治療法といえる。そこで申請者は血管内皮成長因子受容体 (**VEGF**) に対する抗体薬であるベバシズマブに着眼した。ベバシズマブの抗血管新生作用のみならず、併

用薬剤の腫瘍局所への到達を補助するなど様々な作用をもつ薬剤と考えられている (**Willet et al Nature Med 2004**)。我々は基礎的に **EGFR-TKI** とベバシズマブ併用の効果を報告しており (**Ichihara, Ohashi et al Cancer Res 2009, Ninomiya et al Mol Cancer res 2013**)、また臨床試験で **EGFR-TKI** であるエルロチニブとベバシズマブの併用療法の忍容性と有用性が報告された (**Seto et al Lancet Oncol 2015**)。

以上踏まえ、申請者は **2014-2015** 年度科研費 (若手スタートアップ科研 **No.1453084**) の補助をうけ、ベバシズマブを併用することで効果の減弱なしにアファチニブ、セツキシマブを減量、毒性軽減できる可能性を検証した。結果、**EGFR T790M** を有する肺癌細胞株の **in vivo** モデルにて、アファチニブ、セツキシマブを減量することで体重減少など毒性が改善し、かつ再現性をもって腫瘍が完全奏効することを示した (図1 **Kudo, Ohashi et al Mol Oncol 2017**)。重要なことに **4** 週間の治療後に **4** 週間の無治療観察を行っても、ベバシズマブ併用 **3** 剤併用群のみ完全奏効を維持し、また再現性をもって病理学的にも完全奏効することを確認した。

今回の申請ではこれまでの結果を踏まえ、さらに発展、改良させるべく、第 **2** 世代 **EGFR-TKI** であるアファチニブを第 **3** 世代 **EGFR-TKI** へ切り替えることで、**EGFR T790M** を有する肺癌に対してさらに高い効果を得られる可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、第 **3** 世代 **EGFR-TKI** であるオシメルチニブと抗 **EGFR** 抗体であるセツキシマブにて癌の原因である **EGFR** をより強力に阻害し、さらに血管新生阻害薬であるベバシズマブを上乗せする **3** 剤併用療法の効果を基礎的に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

EGFR T790M 遺伝子陽性の肺癌細胞株を用いた皮下腫瘍マウスモデル

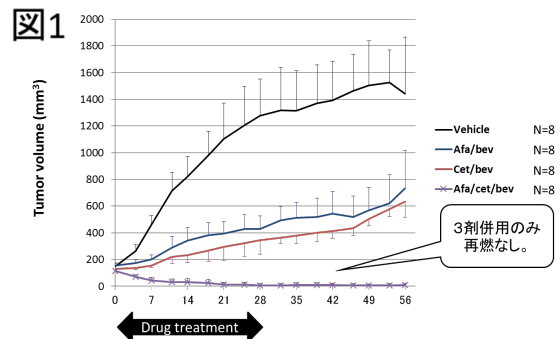
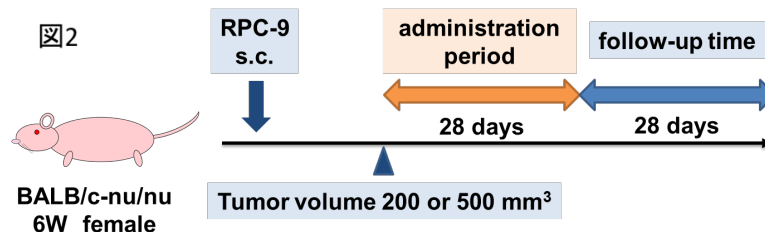


図2
 耐性遺伝子 EGFR T790M を有する肺腺癌細胞株 2 つ (H1975 および RPC-9) を用いて、皮下腫瘍マウスモデルを図 2 に示すように作製した。具体的には、それぞれ細胞を 500 万/site で皮下注射を行い、10 日

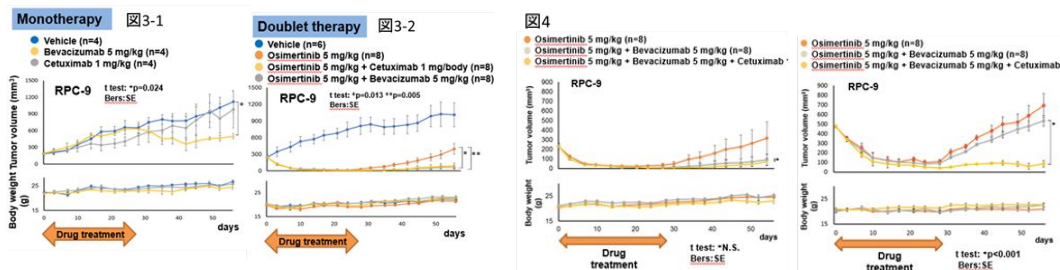


後に腫瘍形成を確認し、薬剤投与を開始した。コントロール群・オシメルチニブ群・セツキシマブ群・ペバシズマブ群・オシメルチニブ/セツキシマブ群・オシメルチニブ/ペバシズマブ群・セツキシマブ/ペバシズマブ群・オシメルチニブ/セツキシマブ/ペバシズマブ群に分けてそれぞれ単剤、2 剤併用および 3 剤併用の効果を検証した (図 3、4)。

オシメルチニブは 5 mg/kg/日を週 5 回経口投与、セツキシマブは 1mg/body を週 1 回、ペバシズマブは、5 mg/kg を週 2 回腹腔内投与とする。各群における腫瘍体積の変化・再増大までの期間・体重減少について検討を行った。治療期間は 4 週間とした。4 週間の治療期間後は、さらに無治療で 4 週の間、経過を観察し、治療効果の程度を確認した。4 週間の観察後に、各群のマウスを安楽死させ、腫瘍検体を得た。その得られた検体を用いて、viable な細胞の残存の確認のため in vitro で再度細胞株の樹立へ戻すことを試みた。EGFR を含む細胞シグナルの変化、腫瘍内血管の量、アポトーシスの有無などにつき、Western Blotting 法や免疫染色などを用いて検討した。

4. 研究成果

EGFR T790M を有する肺癌細胞株である H1975 および RPC-9 細胞のマウス皮下腫瘍モデルを作成し、オシメルチニブ、セツキシマブおよびペバシズマブの単剤、2 剤併用、および 3 剤併用の効果を比較検証した。オシメルチニブ、セツキシマブおよびペバシズマブの単剤 (図 3-1) の効果は限定的であり、2 剤併用は単剤より強い抗腫瘍効果を示した (図 3-2)。



治療開始時の腫瘍体積が 200mm³ と小さい場合は、2 剤併用で十分効果があり、3 剤治療の効果の優越性は示すことができなかったが、500mm³ と治療開始時の腫瘍量が大きくなると 2 剤併用での腫瘍制御が低下し、3 剤併用が最も腫瘍制御する効果が高いことがわかった (図 4)。

3 剤併用が強い効果をきたす理由として、腫瘍増大に伴い腫瘍内の HIF-1 が増多しており、それに伴う growth factor の増加の可能性がある。

現在、国内外でオシメルチニブと抗 EGFR 抗体、オシメルチニブと血管新生阻害薬など 2 剤併用の臨床試験が進行中である。今回の研究結果を踏まえ、次のステップとしてオシメルチニブ、セツキシマブ、ペバシズマブ 3 剤併用療法の臨床開発の折衝を企業と行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Tamura Tomoki, Kato Yuka, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Makimoto Go, Gotoda Hiroko, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Tanaka Takehiro, Ichimura Koichi, Maeda Yoshinobu, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, Potential influence of interleukin-6 on the therapeutic effect of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations, Biochemical Biophysical Research Communications, 査読有, 495 巻, 2018 年, 360-367

DOI:10.1016/j.bbrc.2017.10.175

Ninomiya Takashi, Nogami Naoyuki, Kozuki Toshiyuki, Harada Daijiro, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Kuyama Shoichi, Kudo Kenichiro, Bessho Akihiro, Fukamatsu Nobuaki, Fujimoto Nobukazu, Aoe Keisuke, Shibayama Takuo, Sugimoto Keisuke, Takigawa Nagio, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, A phase I trial of afatinib and bevacizumab in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1404, Lung Cancer, 査読有, 115 巻, 2018 年, 103-108

DOI:10.1016/j.lungcan.2017.11.025

Hotta Katsuyuki, Aoe Keisuke, Kozuki Toshiyuki, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro,

Ichihara Eiki, Kubo Toshio, Ninomiya Takashi, Chikamori Kenichi, Harada Daijiro, Nogami Naoyuki, Hirata Taizo, Hinotsu Shiro, Toyooka Shinichi, Kiura Katsuyuki, A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non-Small Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 査読有, 13 巻, 2018 年, 273-279

DOI:10.1016/j.jtho.2017.10.032

Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Tomida Shuta, Higo Hisao, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki, MET or NRAS amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib, *Scientific Reports*, 査読有, 8 巻, 2018 年, 1955-1965

DOI:10.1038/s41598-018-20326-z

Makimoto Go, Kubo Toshio, Oze Isao, Ohashi Kadoaki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Soh Junichi, Toyooka Shinichi, Katsui Kuniaki, Takigawa Nagio, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Second primary cancer in survivors of locally advanced non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiation followed by surgery, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 査読有, 48 巻, 2018 年, 287-290

DOI:10.1093/jjco/hyy003

Kato Yuka, Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Tomida Shuta, Makimoto Go, Watanabe Hiromi, Kudo Kenichiro, Matsumoto Shingo, Uemura Shigeki, Goto Koichi, Ichihara Eiki, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Toyooka Shinichi, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki, Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring ROS1 fusions, *Cancer Science*, 査読有, 109 巻, 2018 年, 3149-3158

DOI:10.1111/cas.13752

Osawa Masahiro, Ohashi Kadoaki, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Takata Saburo, Takigawa Nagio, Takata Minoru, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Effect of Vandetanib on Lung Tumorigenesis in Transgenic Mice Carrying an Activating Egfr Gene Mutation. *Acta Medica Okayama*. 査読有, 70 巻, 2016 年, 243-253

DOI:10.18926/AMO/54499

Isozaki Hideko, Hotta Katsuyuki, Ichihara Eiki, Takigawa Nagio, Ohashi Kadoaki, Kubo Toshio, Ninomiya Takashi, Ninomiya Kiichiro, Oda Naohiro, Yoshioka Hiroshige, Ichikawa Hirohisa, Inoue Masaaki, Takata Ichiro, Shibayama Takuo, Kuyama Shoichi, Sugimoto Keisuke, Harada Daijiro, Harita Shingo, Senda Toshiaki, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Protocol Design for the Bench to Bed Trial in Alectinib-Refractory Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Harboring the EML4-ALK Fusion Gene (ALRIGHT/OLCSG1405). *Clinical Lung Cancer*, 査読有, 17 巻, 2016 年, 602-605

DOI:10.1016/j.clcl.2016.05.005

Oda Naohiro, Hotta Katsuyuki, Yoshioka Hiroshige, Kudo Kenichiro, Ichihara Eiki, Kato Yuka, Ninomiya Kiichiro, Minami Daisuke, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Sato Akiko, Takigawa Nagio, Tabata Masahiro, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Potential influence of being overweight on the development of hepatic dysfunction in Japanese patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer undergoing gefitinib monotherapy: the Okayama Lung Cancer Study Group experience. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 査読有, 78 巻, 2016 年, 941-947

DOI:10.1007/s00280-016-3146-z

Kudo Kenichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Higo Hisao, Kato Yuka, Kayatani Hiroe, Kurata Yasuko, Takami Yoichiro, Minami Daisuke, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Yoshino Tadashi, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Triplet therapy with afatinib, cetuximab, and bevacizumab induces deep remission in lung cancer cells harboring EGFR T790M in vivo, *Molecular Oncology*, 査読有, 11 巻, 2017 年, 670-681

DOI:10.1002/1878-0261.12063

Suzawa Ken, Yamamoto Hiromasa, Ohashi Kadoaki, Hashida Shinsuke, Tomida Shuta, Kubo Toshio, Maki Yuho, Soh Junichi, Tsukuda Kazunori, Kiura Katsuyuki, Miyoshi Shinichiro, Toyooka Shinichi, Optimal method for quantitative detection of plasma EGFR T790M mutation using droplet digital PCR system. *Oncology Reports*, 査読有, 37 巻, 2017 年, 3100-3106

DOI:10.3892/or.2017.5567

Kuyama Shoichi, Ochi Nobuaki, Bessho Akihiro, Hotta Katsuyuki, Ikeda Genyo, Kishino Daizo, Kubo Toshio, Harada Daijiro, Fujimoto Nobukazu, Nakanishi Masamoto, Umeno Takahiro, Okada Toshiaki, Chikamori Kenichi, Yamagishi Tomoko, Ohashi Kadoaki, Ichihara Eiki, Takigawa Nagio, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, A phase II trial of carboplatin plus S-1 for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer with wild-type epidermal growth factor receptor: The Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1202. *Lung*

〔学会発表〕(計4件)

Nishii Kazuya, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Higo Hisao, Ninomiya Kiichiro, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Rai Kammei, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Kiura Katsuyuki. In vivo efficacy of triplet therapy with osimertinib, cetuximab and bevacizumab for lung cancer cells harboring EGFR T790M, AACR Annual Meeting, 2018 April 14-18, Chicago, Illinois

Ohashi Kadoaki, Higo Hisao, Makimoto Go, Kudo Kenichiro, Nishii Kazuya, Ninomiya Kiichiro, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Rai Kammei, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Kiura Katsuyuki. The novel osimertinib resistant lung cancer mice model harboring EGFR mutations driven by the SP-C promoter, AACR Annual Meeting, 2018 April 14-18, Chicago, Illinois

Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Tomida Shuta, Kayatani Hiroe, Tamura Tomoki, Higo Hisao, Makimoto Go, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Kiura Katsuyuki. Acquired resistance to the third-generation EGFR inhibitor ASP8273 is associated with MET or NRAS gene amplifications in preclinical models, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

Makimoto Go, Ohashi Kadoaki, Nishii Kazuya, Tomida Shuta, Kayatani Hiroe, Tamura Tomoki, Higo Hisao, Ninomiya Kiichiro, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Kiura Katsuyuki. A comprehensive analysis of autopsied specimens and patient-derived cell lines in ALK-positive lung cancers with rapid acquired resistance to alectinib, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

〔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
なし。

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 榎本 剛

ローマ字氏名: (Makimoto, Go)

研究協力者氏名: 西井 和也

ローマ字氏名: (Nishii, Kazuya)

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。