

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09667

研究課題名(和文) 難治性あるいは希少肺癌克服のための肺癌基礎研究臨床応用システムの構築

研究課題名(英文) Development of translational research system to overcome refractory or rare lung cancer

研究代表者

安田 浩之 (YASUDA, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70365261

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)：肺癌は癌死因一位の予後不良の疾患である。近年の分子生物学的解析により肺癌の遺伝子変異などが明らかになり新規治療法開発から肺癌患者の予後は改善しつつある。しかし、それら新規治療法をもってしても進行肺癌患者の多くは診断から数年のうちに肺癌の進行によって死亡する。今後さらに肺癌患者の予後を改善するには、臨床を反映する肺癌の分子生物学的理解が必須である。本研究では難治性あるいは希少な肺癌を克服するためのトランスレーショナル研究システムの構築を行った。具体的には、患者毎に薬剤への耐性化機序を明らかにするとともに、希少な遺伝子変異を有する肺癌に対する新たな治療戦略の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年肺癌領域ではがんゲノム医療が普及し、癌細胞の体細胞遺伝子変異に応じて患者毎に最適な治療薬を選択する個別化医療が可能になっている。しかし、このようにして最適な薬剤が判明した場合であっても多くの患者では肺癌細胞が薬剤に対する耐性を獲得し、患者予後を不良にしている。また、希少な遺伝子変異を有する肺癌に対しては最適な薬剤を選択する手法がなく医療現場における問題となっている。本研究では、患者毎に耐性化機序を解明するシステム、希少な肺癌に対して *in silico* で最適な治療薬を選択するシステムを構築した。これら知見は、肺癌領域における個別化医療の質を向上させるものである。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is a leading cause of cancer related-deaths worldwide. Recent molecular characterizations of lung cancer contributed to the improvement of lung cancer patients. However, most advanced lung cancer patients die of lung cancer in several years. To improve the prognosis of lung cancer patients, further characterization of lung cancer is essential at a clinically relevant level. To this end, in this study, we aimed to develop a translational research system to overcome refractory or rare lung cancer. We developed a system to clarify the mechanisms of resistance to molecular target inhibitors in each patient. In addition, we have developed an *in silico* system to predict the drug sensitivity to molecular target inhibitors for lung cancer patients harboring rare driver oncogene mutations. These findings will facilitate the improvement of precision medicine approaches in lung cancer.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 臨床検体 難治性肺癌 希少肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死因第1位の予後不良の疾患である。肺癌克服のため、今まで多くの研究がなされ分子レベルでの病態が明らかになりつつある。2004年にはEGFR変異が、また2007年にはEML4-ALK融合遺伝子が同定された。これらEGFRやALKに対して分子標的治療薬が開発され肺癌患者の予後の改善に貢献してきた。しかし、肺癌患者の予後は依然として不良であり、さらなる治療法の開発、個別化医療の推進が求められている。現在も癌の基礎研究は盛んに行われているが、そこから得られた知見を“今治療中の肺癌患者”に還元することは困難であることが多い。つまり基礎研究から得られた知見が十分に臨床現場に還元できていない現状がある。本研究では、肺癌患者の臨床検体あるいは臨床情報を用いて基礎研究を行い、肺癌患者の治療方針に役立つ知見を還元し患者毎に臨床応用するためのシステムの構築を目指す。

肺癌は分子レベルでは多様性に富む不均一(ヘテロ)な疾患であり、肺癌患者のさらなる予後改善のためには多面的なアプローチが必要である。申請者は、肺癌患者を適切な分子標的治療薬の有無により以下の3つに分類されると考えている。

- A) 古典的EGFR遺伝子変異など、有効な治療法が知られたメジャーな遺伝子異常を有する患者。
- B) 稀な(マイナー)遺伝子異常を有しているが有効な治療法があるか明らかでない患者。
- C) 治療標的となることが知られている遺伝子異常を有していない患者。

肺癌患者全体の予後改善のためには上記全ての患者の予後が改善されることが理想的であるが、現時点でC)に対するアプローチは困難であり、本研究ではA) B)の患者の予後を改善するための研究を進めたい。

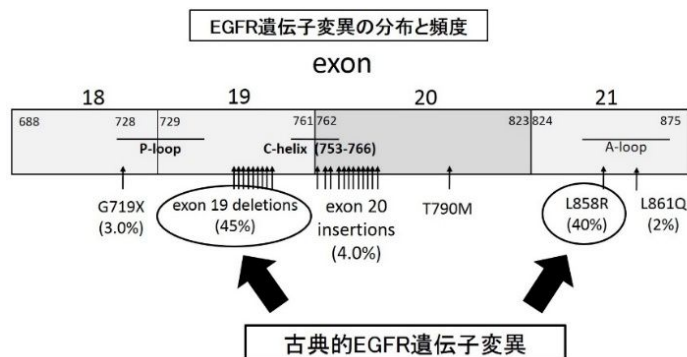
A) 古典的EGFR遺伝子変異など、有効な治療法が知られたメジャーな遺伝子異常を有する患者
この群の患者にとっての問題は、治療開始当初は有効な治療法があるが、その後癌細胞が薬剤に対する耐性を獲得することである。つまり肺癌は難治性であり単独の分子標的治療薬では患者の予後を十分に改善することは困難である。本研究では、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)やALK-TKIなどに対する耐性機序を、癌細胞株あるいはヒト肺癌検体を用いて明らかにし、耐性獲得後の治療戦略に必要な知見の取得を目指す。我々は今までに、EGFR-TKI、ALK-TKIに対する耐性機序を複数報告してきた。本研究では、これら我々が構築した研究基盤を用いて患者毎に分子標的治療薬に対する耐性機序を明らかにするとともに、患者が生存中に得られた知見を臨床に還元するシステムを構築することを目的とする。

- B) 稀な(マイナー)遺伝子異常を有しているが有効な治療法があるかが明らかでない患者

近年、肺癌の多様性を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた肺癌における体細胞変異の同定が活発に行われている。その中で、古典的EGFR遺伝子変異やEML4-ALK融合遺伝子以外のマイナーな体細胞変異が急速な勢いで同定されている。それらマイナーな遺伝子変異が肺癌の生物学上どのような役割を有するのか、临床上患者の治療方針に影響を与えるのかなどは十分に解析されていない。

例えば、右下図に示す通りEGFR遺伝子におけるexon19の欠失変異およびexon21の点突然変異L858Rは、肺癌における全EGFR遺伝子変異の約80-90%を占める古典的遺伝子変異である。これら古典的EGFR遺伝子変異あるいはEML4-ALKを有する肺癌患者の予後は著しく改善した。しかし、それら以外の稀な遺伝子異常で発癌している肺癌に対しては有効な治療法は明らかになっていない。そのため稀な遺伝子変異を有する肺癌患者は適切な分子標的治療薬による治療を受けられていない。

肺癌は患者数の最も多い癌の一つであるが、“肺癌の中の希少癌”に焦点をあてた研究は少ない。我々は以前から肺癌における稀な遺伝子変異に注目し研究を積み重ねてきた。本研究では、今まで築いた研究基盤を発展させEGFR遺伝子以外の遺伝子も含む稀な遺伝子異常に注目し、それぞれに対する薬剤感受性解析を行い、最適な分子標的治療薬の選択を可能にするための知見の集積を目指す。



Yasuda H et al. Lancet Oncol 2011より改変

2. 研究の目的

本研究の目的は、下記の2点である。

患者毎に分子標的治療薬に対する耐性機序を解明するシステムを構築する。

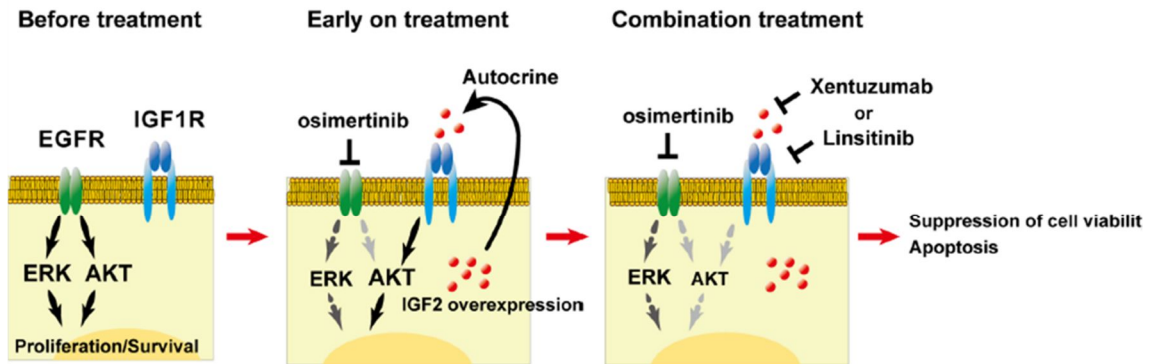
稀な遺伝子変異を有する肺癌に対する最適な治療法の解明を行い患者生存中に得られた知見を臨床現場に還元する。

3. 研究の方法

目的 に対しては、患者検体（手術検体や生検検体）から細胞株等を樹立し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子異常の有無評価、受容体チロシンキナーゼリン酸化アレイを用いた活性化シグナルの解析などを組み合わせて患者ごとの耐性化機序を解明するシステム構築を行った。目的 に対しては、稀な遺伝子変異を有する肺癌患者の臨床情報を集積するために国内最大の癌ゲノム解析ネットワークである SCRUM-Japan との共同研究を行った。また稀な遺伝子変異を有する肺癌患者にとって最適な抗癌剤を選択するためのシステムとして *in silico* での薬剤感受性予測モデルの検証を行った。

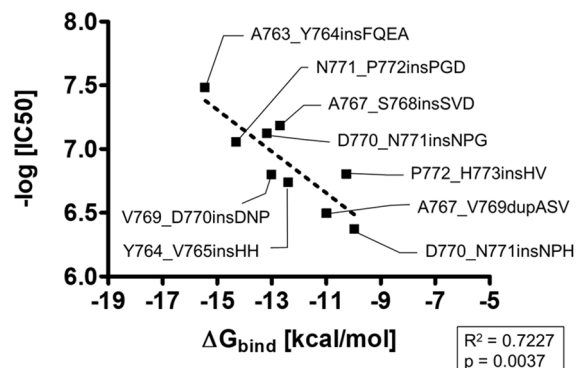
4. 研究成果

目的 に対しては、肺癌患者由来の複数の肺癌細胞株を樹立した。また、ここから患者毎の薬剤耐性化機序を解析する研究基盤を構築した。この中で我々は、臨床で多く使用される EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する新たな耐性化機序を複数明らかにした。そのうちの一つは、IGF2 の過剰発現による耐性化機序である。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では、EGFR が癌細胞の生存に必要なシグナルを核内に伝えている。しかしこれが EGFR チロシンキナーゼ阻害薬によって阻害されると細胞増殖シグナルが入らなくなりアポトーシスに至る。今回我々は、IGF2 の過剰発現が EGFR に代わって生存シグナルを核内に伝えることで EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性化の原因となることを明らかにした（下図）。また我々はこれら IGF2 過剰発現による耐性化が、実際の患者で高頻度に認められることを確認した。本耐性化機序の関わる知見は、患者由来の生きた癌細胞を用いることで得られた知見であり、我々が構築した耐性化機序解明の研究システムの有用性を示している。また近年、肺癌検体に対する次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により発癌や薬剤耐性化に関わる原因を評価する流れがあるが、本研究で同定した IGF2 過剰発現は、ゲノム異常に起因したものではないことを確認した。本研究で得られた知見は、肺癌細胞が薬剤に対する耐性化を獲得するうえで、ゲノム異常以外の機序が起こりうることを示す知見であり、現在のゲノム解析に依存した研究に一石を投じる研究内容である。本研究内容は米国癌学会関連の医学誌に原著論文として報告した（Manabe T, Yasuda H et al. Mol Can Res 2020）。



Manabe T, Yasuda H et al. Mol Can Res 2020

目的 に対しては、前述の通り SCRUM-Japan との共同研究を行い日本人非小細胞肺癌患者の遺伝子変異情報を取得し、肺癌診療における稀な遺伝子変異の多様性を明らかにした。これら稀な遺伝子変異を有する肺癌患者では有効な治療薬が分からず肺癌領域での個別化医療を進めるうえでの障害になっている。申請者らはこれら稀な遺伝子変異を有する肺癌の薬剤感受性を *in vitro* 実験で明らかにした。またこれら薬剤感受性データと比較することで、*in silico* での薬剤感受性予測モデルの有用性を明らかにした。具体的には、*in vitro* 実験で得られた薬剤感受性に関わる数値と、*in silico* で予測した薬剤感受性に関わる数値が高い相関を示すことを明らかにした（右図）。本研究内容は、近年盛んにおこなわれてい



Ikemura S, Yasuda H et al. PNAS 2019

るがんゲノム医療の発展に貢献する知見であり、がん診療における新たな治療戦略を提案する知見である。本内容はPNAS誌に原著論文として報告した(Ikemura S, Yasuda H et al. PNAS 2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikemura S, Yasuda H, Matsumoto S, Kamada M, Hamamoto J, Masuzawa K, Kobayashi K, Manabe T, Arai D, Nakachi I, Kawada I, Ishioka K, Nakamura M, Namkoong H, Naoki K, Ono F, Araki M, Kanada R, Ma B, Hayashi Y, Mimaki S, Yoh K, Kobayashi SS, Kohno T, Okuno Y, Goto K, Tsuchihara K, Soejima K.	4. 巻 116(20)
2. 論文標題 Molecular dynamics simulation-guided drug sensitivity prediction for lung cancer with rare EGFR mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 10025-10030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1819430116.	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 Hasegawa H, Yasuda H, Hamamoto J, Masuzawa K, Tani T, Nukaga S, Hirano T, Kobayashi K, Manabe T, Terai H, Ikemura S, Kawada I, Naoki K, Soejima K.	4. 巻 127
2. 論文標題 Efficacy of afatinib or osimertinib plus cetuximab combination therapy for non-small-cell lung cancer with EGFR exon 20 insertion mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 146-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2018.11.039.	査読の有無 有
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 Hirano T, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Niimi T, Mimasu S, Sakagami H, Soejima K, Betsuyaku T	4. 巻 17(4)
2. 論文標題 Pharmacological and Structural Characterizations of Naquotinib, a Novel Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 740-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-17-1033.	査読の有無 有
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 Kameyama N, Chubachi S, Hegab AE, Yasuda H, Kagawa S, Tsutsumi A, Fukunaga K, Shimoda M, Kanai Y, Soejima K, Betsuyaku T.	4. 巻 59(2)
2. 論文標題 Intermittent Exposure to Cigarette Smoke Increases Lung Tumors and the Severity of Emphysema More Than Continuous Exposure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 179-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2017-03750C.	査読の有無 有
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 Masuzawa K, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T.	4. 巻 8(62)
2. 論文標題 Characterization of the efficacies of osimertinib and nazartinib against cells expressing clinically relevant epidermal growth factor receptor mutations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 105479-105491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.22297	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 Hamamoto J, Yasuda H, Aizawa K, Nishino M, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Betsuyaku T, Soejima K.	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Non-small cell lung cancer PC-9 cells exhibit increased sensitivity to gemcitabine and vinorelbine upon acquiring resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 3559-3565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6591.	査読の有無 有
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
---------------------------	-----------------------	----