

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15959

研究課題名（和文）第三世代EGFR-TKIの耐性化機序の解明と臨床への還元システムの構築

研究課題名（英文）Analysis of resistance mechanism to third generation EGFR-TKI and clinical application

研究代表者

額賀 重成（Nukaga, Shigenari）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70645613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：KLOG（Keio Lung oncology Group）を通じて検体回収を行い、それらを利用して非小細胞肺癌細胞株を皮下移植したxenograftマウスモデルおよび第三世代EGFR-TKIに耐性化した肺癌細胞株作成を行うことができた。それらを利用し、第三世代EGFR-TKIへの新しい耐性化機序について報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌では分子生物学的な解明が進められ、特定の遺伝子変異を持つ症例では分子標的薬が奏功し予後の延長が得られる。しかし、その耐性化が問題であり、未だ根治は困難である。EGFR遺伝子変異に対して第三世代EGFRチロシンキナーゼ阻害剤が有効だが、現時点では同薬剤に対する耐性化の克服ができていない。実際に耐性化した臨床検体を回収し耐性化機序を解明することは、肺癌患者の予後延長につながるため学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We collected samples through KLOG (Keio Lung Oncology Group). We established a xenograft model subcutaneously transplanted with a non-small cell lung cancer cell line and lung cancer cells resistant to third generation EGFR-TKI. We reported new resistance mechanism to third generation EGFR-TKI.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR-TKI 耐性化機序 非小細胞肺癌

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。

1. 研究開始当初の背景

進行肺癌は本邦の癌死因の1位を占める予後不良の疾患である。進行肺癌を克服するために癌細胞の特徴について分子レベルで解明が進められ、新規薬剤が開発されてきている。肺癌においては癌の増殖・生存をつかさどる遺伝子の変異 (driver oncogene) を標的とした分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) などが開発され、患者の予後が延長してきている。しかし、これら薬剤が開発されても未だ肺癌を克服するまでには至っていない。この原因の一つとして肺癌細胞の分子標的薬への耐性化が挙げられる。非小細胞肺癌で多くみられる EGFR 遺伝子変異に対しては第一世代から第三世代までの EGFR-TKI が開発されているが1年程度で耐性化し効果が見られなくなる。特に第三世代 EGFR-TKI に耐性化する機序については十分明らかとなっておらず、この機序の解明により更なる肺癌患者の予後延長を期待できる。

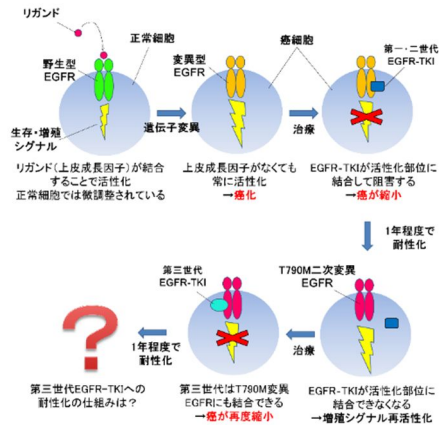


図1 肺癌細胞における EGFR TKI の働きと耐性化
慶應義塾大学病院医療・健康情報サイト KOMPAS より改変

2. 研究の目的

これまでに第三世代 EGFR-TKI に対する耐性機序についていくつかの報告があるが、一部の症例を説明できるのみであり、その他にも未知の耐性機序の存在が複数あることが予想された。本研究の目的は、実際に第三世代 EGFR-TKI へ耐性化した患者から検体を収集し、解析することで実臨床での耐性化の実態を明らかにすることである。また、最終的には患者生存中に耐性機序を特定し、適切な治療を提供することで予後延長につながるシステムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肺癌患者からの検体の収集

慶應義塾大学病院呼吸器内科の関連施設により構成される癌研究グループを通じて、第三世代 EGFR-TKI の投与後に耐性化した症例から検体を採取し、慶應義塾大学呼吸器内科研究室に集約する。

(2) 収集した検体の耐性機序の検討

得られた検体の耐性機序を明らかにするために、研究室にて検討を行う。薬剤感受性試験等の追加実験を行うために、収集した肺癌細胞をマウスに移植して作成する患者腫瘍組織移植モデル (Patient-derived xenograft: PDX) および培養細胞株の樹立を行う。

(3) 臨床情報との統合

同定した耐性機序の結果と研究グループから収集した臨床情報 (年齢や既往歴等の患者背景、画像検査経過、臨床経過など) を統合することで、各耐性機序の頻度を明らかにするとともに、各耐性機序が出現しやすい患者背景の違いについて明らかにする。また、各症例を追跡調査することで各耐性機序での予後の違いについても検討する。

(4) 臨床への耐性情報の還元、実臨床での薬剤感受性の検討

PDX や培養細胞株で得られた薬剤感受性情報を元に、臨床試験や治験を立案し、実際の耐性化症例における薬剤有効性の検討を行う。また、患者情報や検体の収集、耐性機序の解析などの一連の流れにおいて発生した問題点を検討、解決し、最終的には患者の生存中に耐性機序を特定し、各耐性機序に有効な薬剤の情報を臨床に還元できるシステムの構築を行う。

4. 研究成果

慶應義塾大学病院関連施設により構成される癌研究グループを通じて、患者から検体を収集し、バイオバンクを構築した。また、肺癌患者から採取した液性検体を使用して、患者由来肺癌細胞株の樹立も同時に行った。

当初は得られた検体を解析することで耐性機序を検討する予定としていたが、既存の肺癌細胞株

胞株を使用した検討も並行して行った。肺癌細胞株における EGFR-TKI 治療後のシグナル伝達をダイナミックに評価するために産業技術総合研究所が作成したリン酸化タンパク質アレイを用いた。この手法は 1,205 のシグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化を網羅的に評価することができ、数学的計算アプローチを組み合わせることで 307 のシグナル伝達経路の活動を評価することができる。

我々は EGFR exon19 deletion の遺伝子変異を有する PC9 肺癌細胞株に対して EGFR 阻害剤である erlotinib を投与し、このリン酸化タンパク質アレイを用いて評価を行った(図 2)。

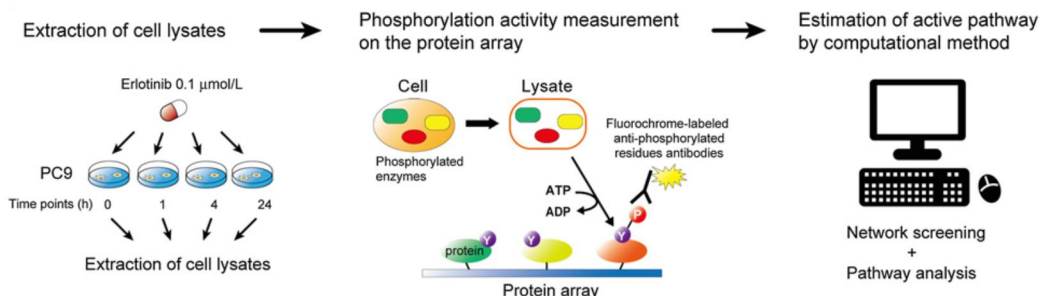


図 2 リン酸化タンパク質アレイの分析ワークフローの概略図

その結果、EGFR 阻害剤投与後早期からインスリン様成長因子受容体 (insulin-like growth factor 1 receptor : IGF1R) バイパスシグナルが活性化することを発見した。第三世代 EGFR-TKI 耐性株においても同様の活性化が見られるかについて、in vitro で樹立した Osimertinib 耐性肺癌株である PC9AZDR で評価したところ IGF1R が有意に活性化していることがわかった。この知見をもとに、PC9AZDR と第三世代 EGFR-TKI に耐性化した患者由来の肺癌細胞株である KOLK43 の 2 つの細胞株を用いて、IGF1R バイパスシグナルの生物学的意義について検討した。

まず、IGF1R 阻害薬である Linsitinib が Osimertinib と併用することで耐性株の増殖が抑制され、さらにはアポトーシスを誘導することを確認した。また、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor : IGF) 関連遺伝子の発現プロファイルを定量することで、IGF1R のリガンドであるインスリン様成長因子 2 (insulin-like growth factor 2 : IGF2) が過剰発現していることを発見した(図 3)。

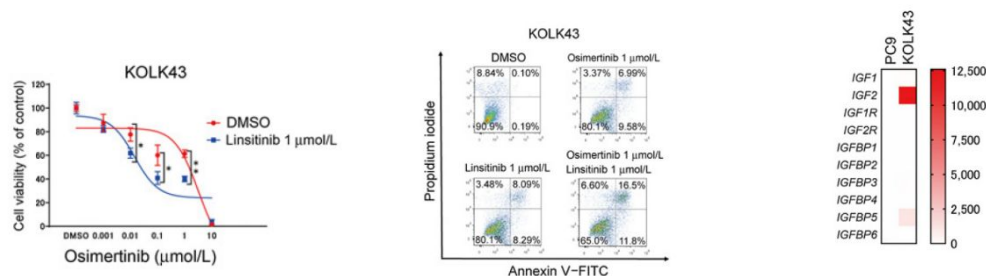


図 3 患者由来肺癌細胞株 KOLK43 における IGF1R バイパスシグナルの検討

(左) MTS アッセイでの Linsitinib 投与による細胞増殖抑制についての評価

(中) フローサイトメトリーでの Linsitinib によるアポトーシスの誘導についての評価

(右) 定量 RT-PCR での KOLK43 における IGF 関連遺伝子発現の評価

siRNA による IGF2 の発現抑制や IGF 中和抗体 Xentuzumab が Osimertinib と併用効果を認めたことから、IGF2 が IGF1R 活性化に寄与していることを証明した。さらに、KOLK43 を使用して患者腫瘍組織移植マウスモデル (Patient-derived xenograft : PDX) を作成し、免疫染色により、IGF2 が腫瘍細胞から自己分泌されることを in vivo でも確認した。そして、薬剤感受性試験を行い、Osimertinib と Linsitinib が併用効果を認めることを in vivo でも証明した(図 4)

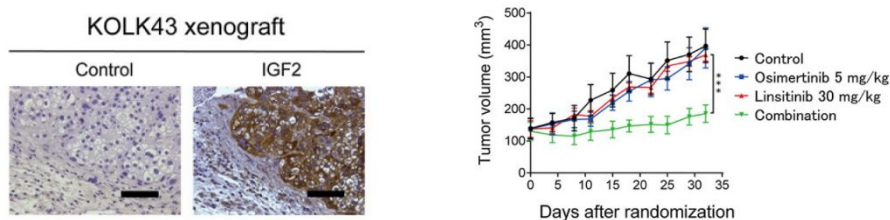


図 4 患者腫瘍組織移植マウスモデル (Patient-derived xenograft : PDX) における検討

(左) KOLK43 PDX から採取した腫瘍組織での免疫化学組織染色による IGF2 過剰発現の確認

(右) KOLK43 PDX への Osimertinib、Linsitinib 投与による腫瘍増大抑制の評価

そして臨床検体を収集して構築したバイオバンクの中から、Osimertinib 耐性化前後に得た臨床検体を用いて、IGF2 の発現量が異なるかの比較検討を行った。その結果、4/6 症例で Osimertinib 耐性化後に IGF2 発現量の上昇を認め、IGF2 過剰発現による耐性化が臨床でも起こりえることを示した(図 5)。

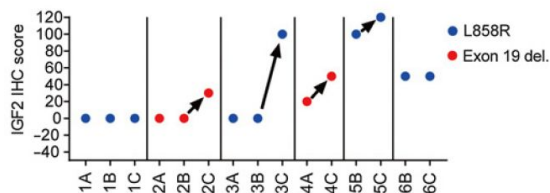


図 5 Osimertinib 投与過程の患者検体における免疫組織化学染色による IGF2 発現量の変化

以上より、本研究では IGF2 自己分泌による IGF1R 活性化が Osimertinib の耐性化機序(図 6)であることを証明し、これを報告した(Manabe T. et al. Mol Cancer Res. 2020;18(4):549-559.)。

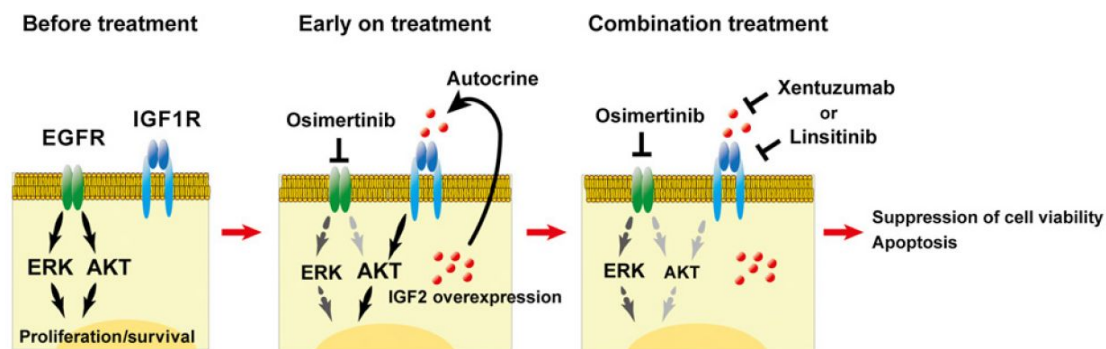


図 6 IGF2 過剰発現によって引き起こされる耐性メカニズムの略図

本研究結果は Osimertinib 耐性後の肺癌患者の治療選択肢を広げる可能性があり、非常に重要な報告である。

我々の研究グループは野生型 EGFR の活性化が第三世代 EGFR-TKI への耐性機序に関与していることについても既に報告しており(Nukaga S. et al. Cancer Res. 2017;77(8):2078-2089.)、今後は更に臨床検体を集めて解析することで、これら耐性化機序の頻度や臨床所見の特徴等の情報を集積し、実臨床へ研究成果を還元することを目指している。

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 Tadashi Manabe, Hiroyuki Yasuda, Hideki Terai, Harumi Kagiwada, Junko Hamamoto, Toshiki Ebisudani, Keigo Kobayashi, Keita Masuzawa, Shinnosuke Ikemura, Ichiro Kawada, Yuichiro Hayashi, Kazuhiko Fukui, Katsuhisa Horimoto, Koichi Fukunaga and Kenzo Soejima	4. 巻 18(4)
2. 論文標題 IGF2 Autocrine-Mediated IGF1R Activation Is a Clinically Relevant Mechanism of Osimertinib Resistance in Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 549-559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-19-0956	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
---------------------------	-----------------------	----