

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03665

研究課題名(和文) 分子標的薬で肺がんの根治を目指す治療の非臨床研究基盤の形成

研究課題名(英文) Formation of a non-clinical research base for treatment aimed to eradicate lung cancer by targeted drugs

研究代表者

矢野 聖二 (Yano, Seiji)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的薬に曝露されたがん細胞は、一部が抵抗性細胞として生存し後に増殖を可能にする耐性因子を獲得して耐性腫瘍を形成する。本研究では、AXL低発現のEGFR変異肺がん細胞は転写因子FOXA1の発現が上昇しIGF-1Rを活性化させ、EGFR阻害薬オシメルチニブ抵抗性を惹起することを見出した。また、TP53変異やSTAT3の活性化はALK阻害薬に対するアポトーシス抵抗性を惹起し、ALK融合遺伝子陽性肺がんのALK阻害薬抵抗性の原因になること、プロテアソーム阻害薬やSTAT3阻害薬併用によりALK阻害薬の治療効果を増強しう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

分子標的薬は標的を有するがん患者に著効するが、一部のがん細胞が抵抗性となって生き残り、再発する原因となる。本研究では一部のがん細胞が生き残るメカニズムとして正常細胞がもともと持っている蛋白質を活性化させたり、がん細胞が持っている遺伝子異常により細胞を死にくくさせることを明らかにした。この研究成果が分子標的薬の治療効果を高める治療法開発に結び付くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells exposed to targeted drugs emerge tolerant cells that allow some to survive as resistant cells and later proliferate. In this study, we found that EGFR-mutated lung cancer cells with low AXL expression emerge tolerant cells to the EGFR inhibitor osimertinib by increasing the expression of the transcription factor FOXA1 to activate IGF-1R. We further found that TP53 mutation and STAT3 activation induce apoptosis resistance to ALK inhibitors and cause ALK inhibitor tolerance in ALK rearranged lung cancer cells. In addition, combined use of proteasome inhibitors or STAT3 inhibitors could augment the efficacy of ALK inhibitors against ALK rearranged lung cancer cells.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：分子標的薬 抵抗性 EGFR変異 ALK融合遺伝子 NTRK1融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんは、我が国のがん死亡原因の第一位であり、肺がんによる死亡数は現在も増加の一途をたどっている。肺がんの約 85% を占める非小細胞肺がんに対しては、近年免疫チェックポイント阻害薬 (抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体) により、進行期であっても 5 ~ 10% の症例においては治癒が期待できるようになってきた。一方、EGFR 変異や ALK 融合遺伝子などのドライバー遺伝子異常を有する非小細胞肺がんには EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) や ALK-TKI などの分子標的薬がそれぞれ高い確率 (80 ~ 90%) で奏効し、抗がん薬と比較し無増悪生存期間を著明に延長することで、予後の改善に貢献してきた。しかしながら、これらの分子標的薬には獲得耐性が生じ、ほぼ全例で再発するため、治癒せしめることは極めて困難な状況にある。その理由としては、分子標的薬に曝露された際、一部のがん細胞が何らかの機構で適応・順応することで細胞死を免れて生存し、その後増殖に必要な耐性機構を獲得して増殖することにより再発することが考えられる。したがって、肺がんの予後の改善には分子標的薬に対する適応・順応や耐性の分子機構を解明し、有効な治療法を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

EGFR 変異や ALK 融合遺伝子などのドライバー遺伝子異常を有する肺がん細胞株を用い、それぞれに対応する新世代分子標的薬 (オシメルチニブ、アレクチニブなど) を曝露した際に適応・順応する分子機構を解明する。さらに、適応・順応を阻害する薬剤をスクリーニングし、*in vitro* および免疫不全マウスを用いたがん細胞株や患者由来腫瘍モデルにおいて、腫瘍の根治が可能か否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) **分子標的薬に適応・順応あるいは耐性を獲得した細胞株の樹立** : EGFR 変異肺がん細胞株 (PC-9 など) あるいは EML4-ALK 陽性肺がん細胞株 (A925PE3 など) をそれぞれ種々の濃度の EGFR-TKI や ALK-TKI の存在下で 2 日 ~ 30 日培養した。生存した細胞を用い、下記の検討に使用した。

(2) ***in vitro* における耐性メカニズムの解析** : RTK アレイおよび Western blot により活性化している受容体を同定した。種々のサイトカイン発現を ELISA 法で検討した。遺伝子増幅の有無を FISH 法および PCR 法で検討した。細胞増殖は MTT 法で検討した。

(3) **耐性因子に対する阻害薬の EGFR-TKI 耐性克服作用の検討** : (1) で樹立した耐性細胞株に耐性因子を阻害する薬剤と EGFR-TKI や MET-TKI などを添加し、72 時間後の細胞生存を MTT 法で検討した。

(4) ***in vivo* における耐性克服薬の効果の検討** : 耐性細胞株およびそれぞれの親株を免疫不全マウスに移植し、分子標的薬および耐性克服薬を連日経口あるいは週二回腹腔内投与した。IVIS でモニタリングを行い耐性が獲得された時点で、耐性因子に対する阻害薬を上乗せし、髄膜がん腫瘍が改善するか否かを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) AXL 低発現 EGFR 変異肺がんにおけるオシメルチニブ抵抗性機構

分子標的薬に曝露されたがん細胞は、一部が抵抗性細胞として生存し後に増殖を可能にする耐性因子を獲得して耐性腫瘍を形成する。AXL は Gas6 をリガンドとするチロシンキナーゼ型の細胞膜受容体であるが、AXL 高発現 EGFR 変異肺がん細胞は、AXL からのシグナルでオシメルチニブ (第 3 世代 EGFR-TKI) に抵抗性となることを 2019 年に報告した。

本研究において、AXL 低発現の EGFR 変異肺がん細胞にオシメルチニブを曝露した際、チロシンキナーゼ型受容体である IGF-1R の発現が上昇し、その結果リン酸化も増強されることを見出した。その下流分子としては ERK や AKT の関与が示唆された。次に、siRNA による IGF-1R の発現抑制によりオシメルチニブの感受性が増強することを確認し、IGF-1R が確かに適応・順応に関与していることを明らかにした。オシメルチニブにより IGF-1R 発現が増強する機構として、転写因子 FOXA1 の発現が誘導された結果 IGF-1R の転写が促進されることを見出した。

さらに、IGF-1R 阻害薬(Linsitinib)を併用することで AXL 低発現 EGFR 変異肺がん細胞株のオシメルチニブの感受性を増強できることを *in vitro* の培養系で示した。また、AXL 低発現 EGFR 変異肺がん細胞株である HCC4006 を免疫不全マウスの皮下に移植した CDX (Cell line Derived Xenograft)モデルや患者腫瘍移植(PDX:Patient-derived xenograft)モデルにおいて、IGF-1R 阻害薬の 10 日間併用によりオシメルチニブ中止後も腫瘍が消失し再増大しないことを見出した。

以上の結果から、AXL 低発現の EGFR 変異肺がんに対しては IGF-1R 阻害薬を短期間オシメルチニブに併用することで、治癒または著明な抗腫瘍効果の増強が得られる可能性が示された。

## ( 2 ) EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおける分子標的薬抵抗性機構

日本人における ALK 融合遺伝子陽性肺がんのデータを解析し、ALK 融合遺伝子陽性肺がん症例の 25%に TP53 の変異があり、変異型では ALK 阻害薬の無増悪生存期間が短いことを明らかにした。次に、TP53 変異を有する ALK 融合遺伝子陽性肺がん株では ALK 阻害薬によるアポトーシスが惹起されがたいために抵抗性となることを明らかにした。さらに、プロテアソームにより分解されるアポトーシス促進蛋白質 Noxa をプロテアソーム阻害薬で蓄積させることにより、ALK 阻害薬によるアポトーシスを誘導し耐性を克服しうることを明らかにした。

また、ALK 阻害薬にさらされた ALK 融合遺伝子陽性肺がん細胞では、STAT3 が活性化され抵抗性細胞を生じる要因になっていること、STAT3 阻害薬を併用することで抵抗性細胞の発生を抑制し ALK 阻害薬の効果を増強できることを明らかにした。

## ( 3 ) NTRK 融合遺伝子がん細胞における分子標的薬的抵抗性機構

NTRK1 融合遺伝子陽性がん細胞は TRK 阻害薬に感受性を有するが、NTRK1-G595R 変異により耐性を獲得することが知られている。TRK 阻害薬エヌトレクチニブに対し獲得耐性となった NTRK1 融合遺伝子陽性がん細胞は NTRK1-G595R と MAPK 経路の活性という 2 つの機序により耐性を獲得していること、TRK-G595R にも有効な次世代 TRK 阻害薬と MEK 阻害薬および EGFR 阻害薬の 3 剤併用が最も耐性克服効果が強いことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Fukuda K, Yano S, et al.	4. 巻 112(9)
2. 論文標題 Trametinib overcomes KRAS-G12V-induced osimertinib resistance in a leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR-mutant lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3784-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15035.	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 Yanagimura N, Yano S, et al.	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 STAT3 inhibition suppresses adaptive survival of ALK-rearranged lung cancer cells through transcriptional modulation of apoptosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Npj Precision Oncol	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-022-00254-y.	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 Tanimoto A, Yano S, et al.	4. 巻 27(5)
2. 論文標題 Proteasome inhibition overcomes ALK-TKI resistance by p53 inactivation through Noxa expression in ALK-rearranged NSCLC.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1410-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-2853.	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 Wang R, Yano S, et al.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18442-4.	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 該当する

1. 著者名 Nishiyama A, Yano S, et al.	4. 巻 111(10)
2. 論文標題 MET amplification results in heterogenous responses to osimertinib in EGFR-mutant lung cancer previously treated with erlotinib.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3813-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14593.	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 Arai S, Yano S, et al.	4. 巻 67(3.4)
2. 論文標題 Resminostat, a histone deacetylase inhibitor, circumvents tolerance to EGFR inhibitors in EGFR-mutated lung cancer cells with BIM deletion polymorphism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 343-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.343.	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 Fukuda K, Yano S, et al.	4. 巻 111
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase-3 inhibition overcomes epithelial-mesenchymal transition-associated resistance to osimertinib in EGFR-mutant lung cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2374-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14454.	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 Takeuchi S, Yano S, et al.	4. 巻 111(2)
2. 論文標題 Phase I study of vorinostat with gefitinib in BIM deletion polymorphism/EGFR mutation double-positive lung cancer. Cancer Sci, 2019 Nov 29. doi: 10.1111/cas.14260.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 561-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14260.	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 Adachi Y, Yano S.	4. 巻 58(22)
2. 論文標題 Caput Medusae-like Venous Dilatation in Lung Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 3341-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2577-18.	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 Kita K, Yano S, et al.	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3215-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14171.	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 Wang R, Yano S, et al.	4. 巻 18(5)
2. 論文標題 Distribution and activity of lenvatinib in brain tumor models of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune deficient mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 947-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-0695.	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 Fukuda K, Yano S, et al.	4. 巻 79(7)
2. 論文標題 Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1658-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-2052.	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 Taniguchi H, Yano S, et al.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-08074-0.	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14件(うち招待講演 4件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 矢野聖二
2. 発表標題 分子標的薬抵抗性・耐性の治療標的.
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanimoto A, Yano S.
2. 発表標題 Resistance to targeted therapy stratified with oncogenes or tumor suppressor genes.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳村尚寛, 矢野聖二, 他.
2. 発表標題 ALK 融合遺伝子陽性肺癌における STAT3 阻害薬の併用によるアポトーシス抵抗性の克服.
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木千晶, 矢野聖二, 他.
2. 発表標題 第二世代TRK阻害薬の耐性機構解明と耐性克服治療の探索.
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiji Yano
2. 発表標題 Heterogeneity and drug resistance
3. 学会等名 World Conference on Lung Cancer 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野聖二
2. 発表標題 Circumvention of targeted drug tolerance of lung cancer.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野聖二
2. 発表標題 研究が切り拓く 肺がん治療の最前線
3. 学会等名 第36回日本癌学会市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Yano S.
2. 発表標題 Drug-tolerant persister cells and AXL.
3. 学会等名 The 24th JFCR-ISCC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano S.
2. 発表標題 Circumvention of targeted drug tolerance in lung cancer.
3. 学会等名 International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano S.
2. 発表標題 Circumvention of targeted drug resistance in lung cancer.
3. 学会等名 The Joint Symposium Microenvironment and Precision Oncology. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano S.
2. 発表標題 Mechanism of the intrinsic resistance and emergence of tolerant cells to osimertinib in EGFR mutated lung cancer.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 聖二
2. 発表標題 Circumvention of targeted drug tolerance in EGFR mutated lung cancer.
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 聖二
2. 発表標題 Mechanisms of drug tolerant cells to osimertinib in EGFR mutated lung cancer.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 聖二
2. 発表標題 肺がんの治療抵抗性メカニズムの最新情報.
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学附属病院 がんセンター/金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科  
<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

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
---------	---------