

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07222

研究課題名(和文) SFK活性化を標的としたオシメルチニブ耐性肺癌の新規克服治療研究

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy targeting SFK for overcoming osimertinib resistance in lung cancer

研究代表者

村上 雄一 (Murakami, Yuichi)

九州大学・薬学研究院・共同研究員

研究者番号：60464385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子受容体(EGFR)に活性化変異を有する非小細胞肺癌に対して用いられる第3世代EGFR-TKIであるオシメルチニブは、治療の継続により耐性癌が出現することが知られている。そこで、オシメルチニブの耐性メカニズムを明らかにすることにより、メカニズムに基づいた耐性克服治療を創出することを目的として研究を行った。本研究では、オシメルチニブに対する耐性株を用いた検討により、AXL及びCDCP1の発現増加がSFKを活性化し、オシメルチニブの耐性へ関与していることを明らかにした。AXL、CDCP1、SFKを標的としたオシメルチニブ耐性克服の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オシメルチニブは非小細胞肺癌に対する有効な治療薬であるが、オシメルチニブ耐性癌に対する耐性克服治療の開発が大きな課題である。本研究で、オシメルチニブ耐性肺癌細胞及びオシメルチニブ治療再発患者検体を用いた検討により、AXL、CDCP1がSRCを活性化しオシメルチニブ耐性に関与することを明らかにした。AXL、CDCP1及びSRCファミリーのオシメルチニブ耐性克服治療標的としての可能性を示すことができたことから、今後、オシメルチニブ治療患者の耐性克服治療の創出や適正化治療にも大きく貢献できると期待している。

研究成果の概要(英文)：Osimertinib is a third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) that is developed against EGFR T790M resistance mutation. However, the appearance of tumors resistant to osimertinib has been reported. In this study, osimertinib-resistant non-small cell lung cancer cell lines (OR1 and OR2) which were established from NCI-H1975 cells showed SRC family kinase (SFK), AXL and CUB domain containing protein 1 (CDCP1). Silencing of AXL or CDCP1 induced inhibition of cell proliferation and phosphorylation of SFK and AKT in OR cells. In recurrent lung tumors after treatment with osimertinib, the expression of AXL and CDCP1 was markedly elevated as compared to pretreatments. Increased co-expression of AXL and CDCP1 is thus likely to confer cancer cells resistance to osimertinib, together with SRC co-activation. Taken together, our findings suggest that AXL, CDCP1 and SRC could be effective targets to overcome osimertinib resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：EGFR-TKI SRC 薬剤耐性 オシメルチニブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮成長因子受容体 (EGFR) は肺癌治療の標的分子として知られている。EGFR に活性化変異を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者に対して第 1 世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブが有効であることが 2004 年に発表されて以降、EGFR-TKI は EGFR 活性化遺伝子変異陽性の NSCLC に対して広く用いられている。

(2) EGFR-TKI は EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対して非常に有効であるが、ほとんどの症例で治療抵抗性を示す“耐性癌”による再発が問題となっている。その耐性のメカニズムとして最も頻度が高いのは EGFR の二次変異 (T790M) であるが、その他代替経路の活性化など多様なメカニズムが我々を含む国内外の研究者によって報告されている。

(4) 近年、耐性変異 EGFR T790M を有する肺癌細胞の耐性克服を目的に、第 3 世代 EGFR-TKI としてオシメルチニブが承認された。さらに、2018 年 8 月にオシメルチニブは T790M 耐性変異を持たない EGFR 活性化変異陽性非小細胞肺癌にも適用が拡大され、EGFR 変異陽性肺癌に対するオシメルチニブ治療の重要性はますます高まっている。

(5) しかし、オシメルチニブについても耐性癌が報告され始め、オシメルチニブ耐性肺癌に対する克服治療戦略を進展させることは緊急の課題である。耐性克服治療のために、耐性のメカニズムの詳細な解明とメカニズムに基づいた治療薬の開発が非常に重要である。

(6) 我々はこれまで第 1 世代、第 2 世代、第 3 世代 EGFR-TKI のそれぞれの治療効果や耐性獲得機序について、研究を継続してきた。第 1 世代 EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブの耐性機序として、PTEN 消失、活性化 EGFR 遺伝子の消失、非受容体型チロシンキナーゼの一つである Src の活性化が関与することを明らかにしてきた。そして、第 2 世代 EGFR-TKI のアファチニブの耐性へも Src ファミリーキナーゼ (SFK) の活性化が関与することを報告し、さらにオシメルチニブ耐性にも同様に SFK が関与することを示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

(1) 我々は独自に樹立したオシメルチニブ耐性肺癌細胞で SFK の発現及び活性化の亢進を観察した。しかし、EGFR-TKI 耐性における SFK の直接的な活性化機序は明らかになっていない。

(2) 本研究ではオシメルチニブ耐性肺癌細胞において発現上昇が見られた分子に着目し、SFK 活性化メカニズムを明らかにする。SFK 及び SFK を活性化するタンパク質のオシメルチニブ耐性への寄与を明らかにすることにより、新しい耐性克服治療を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

標的タンパク質の発現抑制

細胞は、EGFR の活性化変異である L858R 及び第 1、第 2 世代 EGFR-TKI に対する耐性変異である T790M を有する非小細胞肺癌株 H1975 (親株) と、H1975 にオシメルチニブを長期暴露することにより樹立したオシメルチニブ耐性株を用いた。細胞株におけるタンパク質の発現抑制は siRNA の導入によって行った。細胞を抗生物質不含培地を用いて播種し、翌日 Opti-MEM 培地及び Lipofectamine RNAiMAX を用いて siRNA を導入した。導入後、発現抑制による細胞増殖への効果の検討、薬剤添加による感受性の検討もしくは細胞を回収しタンパク質発現を検討した。

薬剤感受性の検討

細胞を 96 well plate に播種し、24 時間後薬剤を添加した。薬剤添加後 37°C で 72 時間培養した。Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を 15 μ L 加え 37°C で 2-4 時間培養した後、450 nm の吸光度を測定することにより生細胞を測定した。

SRC と CDCP1 との相互作用の検討

SRC と CDCP1 との結合について共免疫沈降法を用いて検討した。細胞を氷冷 PBS で洗浄した後、バッファーに溶解した。溶解液に SRC もしくは CDCP1 抗体を添加した後、アガロースビーズを添加し、4°C で一晩攪拌した。アガロースビーズを洗浄した後 SDS を含むサンプル buffer 中で 95°C、5 分間処理することによりタンパク質を溶出させ、タンパク質発現をウエスタンブロット法により検討した。

オシメルチニブ耐性肺癌細胞のマウス皮下移植実験

12 時間の明暗サイクル、自由摂食条件下で飼育した BALB/c nu/nu nude マウスの腹部皮下へ、

50% Matrigel に混合した H1975 もしくはオシメルチニブ耐性株を移植し、腫瘍径を測定した。腫瘍体積が 100-200 mm³ に到達してからオシメルチニブ (40µg/mice、1 日 3 回経口投与)もしくはダサチニブ (600 µg/mice、1 日 3 回経口投与)の投与を開始した。投薬開始後 15 日 (H1975) 及び 22 日(オシメルチニブ耐性株) に麻酔下で腫瘍を回収した。

4. 研究成果

これまでに我々は非小細胞肺癌株 H1975 にオシメルチニブを長期暴露することによりオシメルチニブ耐性株を樹立して検討を行ってきた。そして、オシメルチニブ耐性株では SRC ファミリーキナーゼ(SFK)が活性化されていることを観察している。よって、EGFR シグナルの代替経路として SFK シグナルが活性化され細胞の増殖・生存を促進することによって、オシメルチニブ耐性を誘導していることが示唆される。そこで本研究では、SFK のオシメルチニブ耐性への関与及び SFK シグナルの活性化のメカニズムを明らかにし、これらのタンパク質を標的とした新しいオシメルチニブ耐性克服治療を提示することを目的として以下の検討を行った。

(1) オシメルチニブ耐性肺癌細胞の SRC ファミリーキナーゼ(SFK)阻害剤感受性

オシメルチニブ耐性株における SFK シグナルの増殖・生存への関与を明らかにするために、SFK 阻害剤に対する感受性について検討を行った。親株と比較し、オシメルチニブ耐性株ではダサチニブ、サラカチニブ及び PP1 などの SFK 阻害剤に対して高い感受性を示した。この結果より、オシメルチニブ耐性株では SFK が細胞の増殖・生存に重要な役割を担っていることが示唆された。

(2) SFK 活性化機序の検討

オシメルチニブ耐性株における SFK シグナルの活性化の機序を検討するために、オシメルチニブ耐性株で特異的に発現が変動している分子をマイクロアレイ解析によって検討した。その結果、オシメルチニブ耐性株では膜タンパク質の CDCP1 や受容体チロシンキナーゼである AXL の発現が増加していた。これらの発現増加は、RT-qPCR による mRNA 発現測定及びウエスタンブロッティングによるタンパク質発現測定においても観察された。

(3) CDCP1 及び AXL のオシメルチニブ耐性への関与

オシメルチニブ耐性株において CDCP1 及び AXL の発現が増加していたことから、これらのタンパク質がオシメルチニブ耐性株の生存シグナルや細胞増殖に関与していることが示唆される。そこで、siRNA による発現抑制及び阻害剤を用いて、CDCP1 及び AXL の細胞増殖や SFK シグナルへの影響について検討を行った。CDCP1 及び AXL の発現抑制により、オシメルチニブ耐性株は親株と比較して強い増殖抑制効果が観察された。さらに CDCP1 や AXL 発現抑制は SFK のリン酸化及びその下流の AKT のリン酸化を抑制した。AXL 阻害剤を用いた検討においても同様に、オシメルチニブ耐性株の増殖阻害や SFK と AKT のリン酸化阻害が認められた。これらの結果から、オシメルチニブ耐性株では CDCP1 及び AXL が SFK と AKT の活性化を誘導し、細胞の増殖を促進していることが示された。

(4) CDCP1 と SRC の相互作用

CDCP1 は SRC と複合体を形成し、細胞の遊走や生存に関連することが報告されている。そこで、オシメルチニブ耐性株において CDCP1 と SRC が複合体を形成しているか否かについて検討を行った。CDCP1 と SRC のそれぞれの特異的抗体を用いて共免疫沈降を行ったところ、オシメルチニブ耐性株における CDCP1 と SRC タンパク質の結合が観察された。

(5) SFK 阻害によるオシメルチニブ耐性腫瘍の抑制効果

SFK 阻害剤のオシメルチニブ耐性腫瘍に対する有効性を検討するために、マウスへのオシメルチニブ耐性株移植実験を行った。オシメルチニブ耐性株をマウスに皮下移植した後、SFK 阻害剤のダサチニブを投与したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された。一方、オシメルチニブ投与による腫瘍増殖抑制効果は観察されなかった。オシメルチニブ耐性肺癌の腫瘍増殖抑制に SFK 阻害剤投与が有効であることが示唆された。

(6) ヒト再発非小細胞肺癌における AXL 及び CDCP1 の発現

非小細胞肺癌患者組織における AXL 及び CDCP1 の発現について免疫組織化学染色法を用いて検討した。オシメルチニブ治療前腫瘍では AXL 及び CDCP1 発現は低かった一方、治療後の再発肺癌組織では AXL 及び CDCP1 の発現が増加していることが観察された。

以上の結果より、オシメルチニブ耐性に CDCP1 及び AXL の発現増加とそれに伴う SFK の活性化が関与していることが明らかになり、これらのタンパク質を標的とすることによるオシメルチニブ耐性克服治療の可能性が示唆された。

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 Murakami Yuichi, Kusakabe Daiki, Watari Kosuke, Kawahara Akihiko, Azuma Koichi, Akiba Jun, Taniguchi Masahiko, Kuwano Michihiko, Ono Mayumi	4. 巻 12
2. 論文標題 AXL/CDCP1/SRC axis confers acquired resistance to osimertinib in lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12995-8	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 雄一、日下部 大樹、渡 公佑、柴田 智博、河原 明彦、東 公一、桑野 信彦、小野 眞弓
2. 発表標題 オシメルチニブ耐性獲得の新しい分子機序：AXLとCDCP1の発現亢進はSFK活性化に緊密に関連する
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上雄一、渡公佑、柴田智博、桑野信彦、小野眞弓
2. 発表標題 肺癌のオシメルチニブ耐性にSFK, CDCP1, AXLの活性化が関与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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