

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08608
研究課題名(和文) 肺がんの「治療抵抗に関わるシグナル指向性」を標的とした画期的治療・診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy and diagnosis targeted for signal transduction regarding drug tolerance in lung cancer

研究代表者
山田 忠明 (YAMADA, TADAAKI)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00507048
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(EGFR変異肺がん研究の主な成果)1. EGFR変異肺がん細胞の一部では、EGFR阻害薬へのAXL阻害の併用効果を認めた。2. EGFR変異肺がんではAXL高発現はEGFR阻害薬の治療効果が乏しく、効果予測因子であることを明らかにした。
(ALK変異肺がんの主な研究成果)3. ALK肺がん細胞の一部では、ALK阻害薬へのHER3阻害の付加的な細胞増殖抑制の併用効果を認めた。4. ALK肺がん細胞ではHER3シグナルを介した細胞生存に関わるfeedback機構をZEB1が制御し、HER3リガンドNRG1活性化が関与することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性腫瘍である肺がんにおいて薬剤耐性は治療の最大の障壁である。近年、肺がんに対する分子標的薬が臨床応用された。しかしながら、肺がんの一部は治療抵抗を示し、早期に薬剤耐性を生じることが課題である。近年、治療抵抗性細胞の存在が、薬剤感受性の低下を促し、最終的に耐性機構を獲得することが報告され、注目されている。本研究ではEGFR遺伝子変異やALK融合遺伝子変異を有する肺がんを研究対象に複数の治療抵抗性機構を明らかにするとともに新規併用治療を提唱した。特に、本研究成果を基に、EGFR変異肺がんのAXLシグナル阻害を検証する第1相の治療が本邦にて実施され、臨床への還元が実現している。

研究成果の概要(英文)：1) According to lung cancer with EGFR mutations, activated AXL was associated with maintaining cell survival and inducing the emergence of cells tolerant to EGFR inhibitor. AXL inhibition reduced the viability of EGFR-mutated lung cancer cells overexpressing AXL. These results indicated pivotal roles for AXL and its inhibition in the intrinsic resistance to EGFR inhibitors and the emergence of osimertinib-tolerant cells.
2) According to lung cancer with ALK fusion genes, NRG1-HER3 activation, mediated through ZEB1 proteins, help maintain cell survival and induce the emergence of ALK-TKI-tolerant cells. Thus, HER3 activation plays a pivotal role in the emergence of ALK-TKI-tolerant cells and the inhibition of HER3 signals combined with ALK-TKIs dramatically improves treatment outcomes for ALK-rearranged lung cancer.

研究分野：臨床腫瘍学、呼吸器内科学

キーワード：治療抵抗性 分子標的治療 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

難治性腫瘍の代表である肺癌において薬剤耐性は治療の最大の障壁であり、その診断と対策は極めて重要な課題である。近年、いわゆる **Driver** 遺伝子異常である **EGFR** 遺伝子変異や **ALK** 融合遺伝子変異を有する肺癌に対し、その阻害活性を有する分子標的薬が臨床応用されている。しかしながら、肺癌の一部は治療導入時に治療抵抗性を示し、早期に薬剤耐性を生じることが臨床的な課題である。これまでに肺癌分子標的薬の獲得耐性に関する多くの報告があるが、獲得耐性フェーズにおける新規治療法の開発は停滞している。

近年、「治療抵抗性細胞：Drug tolerant cell」の存在が、がん研究領域で大きな注目を集めている。治療抵抗性細胞は、薬剤曝露による細胞死誘導を回避するための何らかの逃避機構を有し、薬剤感受性の低下を促す。その結果、薬剤による細胞死を免れた後、薬剤の長期暴露を経て、最終的に耐性機構を獲得することが報告されている(Hata AN, et al. Nat Med 2016)。また分子標的薬による治療介入は、細胞内 feedback 機構の活性化を誘導し、薬剤感受性低下に関与することが知られている。これまでに肺癌分子標的薬の治療介入時に生じる抵抗性細胞を標的とした新規治療法は開発されていない。

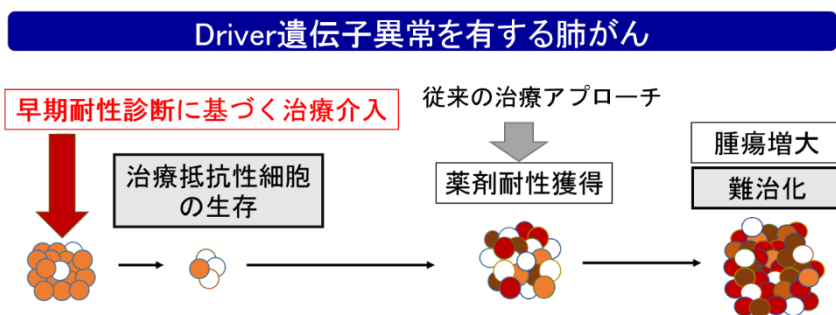


図1 肺癌の分子標的治療による耐性獲得の経過

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床への橋渡し研究として、肺癌治療導入時に生じる「治療抵抗細胞の生存シグナルの指向性」を解明し、画期的な新規治療・診断法を開発することである。

具体的には、①治療導入時に誘導されるがん細胞内での feedback 機構を介した生存シグナルを解明し、その克服法を開発する、②治療抵抗性細胞の出現を予測しうる因子の同定を目指す。

本研究で得られた新たな知見を基に、臨床応用の可能性を模索することを最終目標とした。

3. 研究の方法

【実験 1. 肺癌分子標的薬の治療抵抗性に関わる分子機構の解明】

複数の EGFR 変異肺癌細胞（以下、EGFR 肺癌細胞）および ALK 変異肺癌細胞（以下、ALK 肺癌細胞）をそれぞれの分子標的薬と AXL 阻害の併用効果について細胞増殖アッセイを用いて評価した。EGFR 阻害薬および ALK 阻害薬により誘導され、AXL シグナル制御を介した細胞生存に関わる feedback 機構の詳細を解明するため、Western Blotting 法、免疫沈降法、ELISA 法、リン酸化 array kit, などの分子生物学的手法を用いて検討した。

【実験 2. AXL 阻害薬の併用効果を予測しうる候補因子の探索】

上記実験 1 により評価した AXL による付加的な細胞増殖阻害活性を有するがん細胞と阻害活性を認めないがん細胞の 2 群に分け、その差異に関する分子機構について検討し、本併用治療の効果予測因子の探索を進めた。

【実験 3. 治療抵抗性細胞出現に対する抵抗性機構の阻害作用の効果の検討】

既報 (Sharma SV, et al. Cell 2010) の治療抵抗性細胞の検出方法に倣い、高濃度 EGFR・ALK 阻害薬による長期間治療後に生存しえた治療抵抗性細胞を抽出し、解析した。

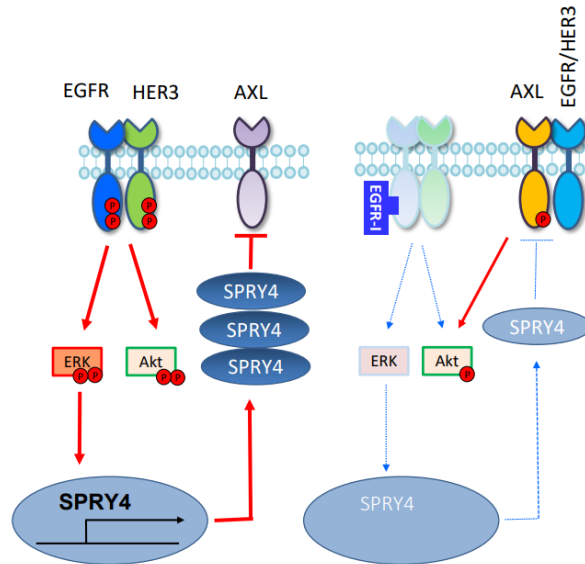
【実験 4. マウス皮下移植モデルを用いた治療効果の検討】

EGFR 変異肺癌細胞および ALK 融合遺伝子肺癌細胞を免疫不全マウスの皮下接種し、腫瘍形成後に EGFR 阻害薬および ALK 阻害薬と AXL 阻害薬の併用による付加的な治療効果・毒性について検証した。

4. 研究成果

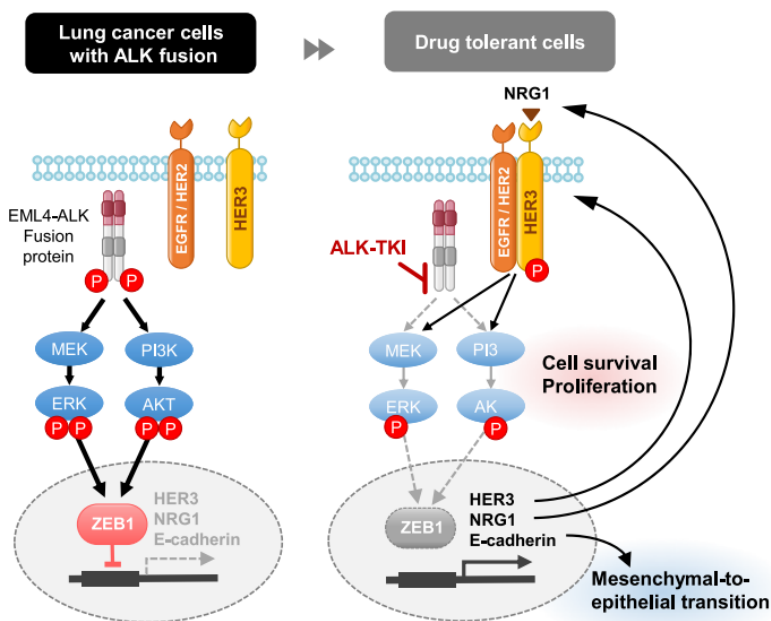
(EGFR 変異肺癌研究における主な成果)

EGFR 変異陽性肺癌細胞に対する EGFR-TKI オシメルチニブ治療導入により、SPRY4/AXL シグナルを介した negative feedback 機構が誘導され、AXL と HER3 のヘテロダイマー結合能を生じて、生存シグナルを維持することを見出した。AXL 高発現を伴う EGFR 変異陽性肺癌細胞に対する AXL 阻害は EGFR-TKI オシメルチニブの治療効果を増強させ、治療抵抗性細胞の生存を抑制した。ヒト肺癌細胞株を用いた実験動物モデルの検討では、初期からの AXL 阻害薬 ON07475 とオシメルチニブの併用が獲得耐性後の併用と比較し、より高い抗腫瘍効果を認めた。



(ALK 変異肺癌研究における主な研究成果)

ALK 肺癌細胞株の ALK-TKI アレクチニブ、ブリガチニブにより、HER3 シグナル活性を伴う治療抵抗性細胞が出現し、HER3 阻害により生存シグナルが抑制された。さらに治療導入時の ALK-TKI と HER ファミリー阻害活性を有するアファチニブ併用治療は HER3 依存的な治療抵抗性細胞の出現を抑制し、ALK-TKI による治療効果を *in vitro*、*in vivo* にて増強した。ALK 肺癌細胞では HER3 シグナルを介した細胞生存に関わる feedback 機構を ZEB1 が制御し、HER3 リガンド NRG1 活性化が関与することを見いだした。加えて、ZEB1 は E-cadherin 転写活性について負の制御を行い、間葉上皮転換 (MET) を誘導することを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okura N, Nishioka N, Yamada T, Taniguchi H, Tanimura K, Katayama Y, Yoshimura A, Watanabe S, Kikuchi T, Shiotsu S, Kitazaki T, Nishiyama A, Iwasaku M, Kaneko Y, Uchino J, Uehara H, Horinaka M, Sakai T, Tanaka K, Kozaki R, Yano S, Takayama K.	4. 巻 26
2. 論文標題 ONO-7475, a Novel AXL Inhibitor, Suppresses the Adaptive Resistance to Initial EGFR-TKI Treatment in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 2244-2256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-2321.	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 Hiroyuki Taniguchi, Tadaaki Yamada, Rong Wang, Keiko Tanimura, Akihiro Nishiyama, Azusa Tanimoto, Yuta Adachi, Shinji Takeuchi, Hiroyuki Yamaguchi, Minoru Fukuda, Koichi Takayama, Hiroshi Mukae, Seiji Yano	4. 巻 10
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 該当する

1. 著者名 Tanimura K, Yamada T, Okada K, Nakai K, Horinaka M, Katayama Y, Morimoto K, Ogura Y, Takeda T, Shiotsu S, Ichikawa K, Watanabe S, Morimoto Y, Iwasaku M, Kaneko Y, Uchino J, Taniguchi H, Yoneda K, Matoba S, Sakai T, Uehara H, Yano S, Kusaba T, Katayama R, Takayama K.	4. 巻 6
2. 論文標題 HER3 activation contributes toward the emergence of ALK inhibitor-tolerant cells in ALK-rearranged lung cancer with mesenchymal features.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Precis Oncol.	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00250-8.	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 -

1. 著者名 Tanimura K, Yamada T, Horinaka M, Katayama Y, Fukui S, Morimoto K, Nakano T, Tokuda S, Morimoto Y, Iwasaku M, Kaneko Y, Uchino J, Yoneda K, Yano S, Sakai T, Takayama K.	4. 巻 522
2. 論文標題 Inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling increased apoptosis and prevented the emergence of ALK-TKI-tolerant cells in ALK-rearranged non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 119-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.09.018.	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tadaaki Yamada, Seiji Yano
2. 発表標題 Novel therapeutic strategies for drug tolerance in NSCLC with driver oncogenes
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田忠明
2. 発表標題 Driver遺伝子変異肺がんにおける初期治療抵抗性機構の解明
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Taniguchi, Tadaaki Yamada, Rong Wang, Keiko Tanimura, Akihiro Nishiyama, Azusa Tanimoto, Yuta Adachi, Shinji Takeuchi, Hiroyuki Yamaguchi, Minoru Fukuda, Koichi Takayama, Hiroshi Mukae, Seiji Yano
2. 発表標題 AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and the emergence of tolerant cells
3. 学会等名 第110回アメリカ癌学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Tanimura, Koutaroh Okada, Kazue Yoneda, Seiji Yano, Mano Horinaka, Toshiyuki Sakai, Ryohei Katayama, Tadaaki Yamada
2. 発表標題 HER3 is a potent therapeutic target for prevention of tolerant cells to ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田忠明、高山浩一
2. 発表標題 ドライバー遺伝子変異肺癌の治療抵抗性克服を目指した新規治療法の開発
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadaaki Yamada, Naoko Okura, Naoya Nishioka, Hirokazu Taniguchi, Kohei Tanaka, Ryohei Kozaki, Seiji Yano, Koichi Takayama
2. 発表標題 ONO-7475, a novel AXL inhibitor, suppresses the emergence and maintenance of tolerant cells to initial EGFR-TKI treatment in EGFR-mutated non-small lung cancer
3. 学会等名 第25回アジア太平洋呼吸器学会（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究分担者	高山 浩一 (TAKAYAMA KOICHI) (50274444)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	内野 順治 (UCHINO JUNJI) (80432946)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

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