

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08625

研究課題名(和文)「persister」がん細胞マウスモデルによる肺癌の根治的薬物療法の開発

研究課題名(英文) Development of a curative treatment strategy for lung cancer using the persister cancer cell mouse model.

研究代表者

大橋 圭明(Ohashi, Kadoaki)

岡山大学・大学病院・研究准教授

研究者番号：60729193

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チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)は、一過性にEGFR変異を有する肺癌(EGFR肺癌)を制御するが根治できない。なぜEGFR-TKIでは根絶できないのか?を探究するため本研究において、独自にEGFR肺癌シンジェニックマウスモデルを作成し、EGFR-TKIからがん細胞がどのように逃避しているか腫瘍微小関係との相互関係を評価した。EGFRシグナルは、腫瘍微小環境を免疫抑制的に誘導し、EGFR-TKIによりCD8陽性T細胞による抗腫瘍免疫が誘導されることを見出した。EGFR-TKI前投与後に、PD-1とVEGFR2阻害薬を逐次的に投与することで抗腫瘍免疫をさらに活性化できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR肺癌は、非喫煙者肺癌の半数以上を占める重要な疾患である。日本人を含む東アジア人に特に発生頻度が高いこと、また若年発症例も多く認めることもあり、臨床的にも社会的にも重要性が高い。本研究は、EGFR-TKIががん細胞を直接阻害しているのみならず、腫瘍免疫を誘導することを初めて明らかにした。抗腫瘍免疫を最大化させることで、EGFR-TKIの治療効果の最大化、完全寛解を目指した治療戦略の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) transiently inhibit but can not eradicate lung cancer with EGFR mutations. In this study, we independently established an EGFR-mutant lung cancer syngeneic mouse model and evaluated how cancer cells escape from EGFR-TKI in coordinated with tumor microenvironment.

We found that EGFR signaling induces an immunosuppressive tumor microenvironment and that EGFR-TKI induces CD8-positive T cells dependent antitumor immunity. Sequential administration of PD-1 and VEGFR2 inhibitors following the treatment with EGFR-TKI further boosted the anti-tumor immunity.

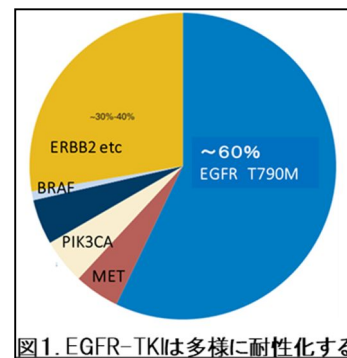
研究分野：呼吸器疾患

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR変異 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

【EGFR 変異を有する肺癌は、EGFR-TKI に著効するが、耐性化し治癒しない】

肺癌は難治性癌の代表であり、癌死亡の第1位である。 従来の病理組織分類に加えて、近年の遺伝子解析技術の発達に伴い発癌の直接的原因となる分子異常(ドライバー変異)の検索が治療戦略を決める上で必須となっている。**日本人非喫煙者において、上皮成長因子受容体(EGFR)変異を有する肺腺癌(EGFR 肺癌)はドライバー遺伝子の約半数を占める非常に重要な疾患である。** EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の臨床効果とEGFR変異の存在が相関することが示され、前臨床モデルでEGFR遺伝子変異による持続的なEGFR活性化が発がんの原因となることも裏付けされた(Ohashi, Kiura Cancer Sci 2008, Ohashi, Kiura Cancer Res 2009)。しかしながら、EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)が治療の中心であるが、**約1~1.5年程度で多様な治療耐性をきたす(図1. Ohashi J Clin Oncol 2013)。**耐性の原因としてEGFR T790M (50 - 60%) MET 遺伝子やHER2 遺伝子増幅、BRAF 変異などが知られる(Ohashi, Kiura PNAS 2012)。EGFR T790M へ阻害効果をもつ第3世代EGFR-TKI オシメルチニブが認可され、さらに長期に肺癌をコントロールすることが可能となった。しかしオシメルチニブも再び耐性化するため、**進行期EGFR肺癌は残念ながら未だに“治癒”は困難な状況にある。**EGFR-TKI および既存の薬物治療では完全寛解、治癒は得られないことは、重要かつ未解決の臨床課題である。



【治癒を目指す新規治療の標的候補として:「persister」がん細胞と腫瘍微小環境】

耐性獲得の過程として、以下の2つが提唱されている。

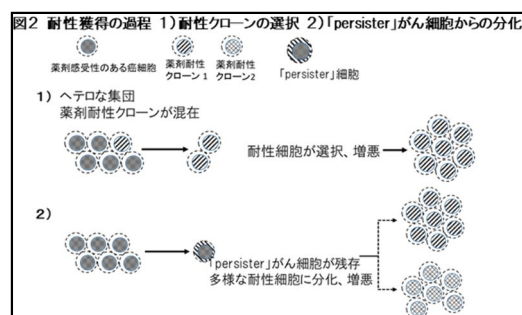
1) 耐性クローンの選択増多

図2-1)の様にもともと少数ながら存在していた薬剤耐性クローンが選択され増多してくる。

2) 「persister」がん細胞からの耐性細胞の分化

図2-2)の様に「persister」がん細胞から、薬剤耐性クローンがde novoに分化してくる。

「persister」がん細胞: 直訳でしつこく生き残る細胞
 遺伝的な耐性因子(薬剤耐性遺伝子や遺伝子突然変異など)を持たないにもかかわらず、高い生存能を示す。薬剤耐性遺伝子変異などの耐性因子を獲得するまでの橋渡しをすると考えられている。



近年、EGFR-TKI によって肺癌細胞が根絶できない原因として、この「persister」がん細胞が注目されている。申請者らもEGFR変異肺癌細胞株にEGFR-TKIを曝露し、72h後に生き残っている「persister」がん細胞の検討を行った。「persister」がん細胞に、HER2シグナルの活性化を認め、EGFR-TKIとHER2阻害薬トラツズマブ エムタンシンの併用により制御できる可能性について報告した(Kayatani, Ohashi, Kiura BBRC 2020)。しかしin vitroの検討では、「persister」がん細胞が周囲の間質細胞とどのような相互作用をしているのかを検討することは困難である。またヌードマウスなど免疫不全マウスを用いたゼノグラフトモデルでは腫瘍微小環境を適切に評価することは難しいと考えた。

以上を踏まえ、EGFR変異を有する肺癌において、下記の問いに至った。

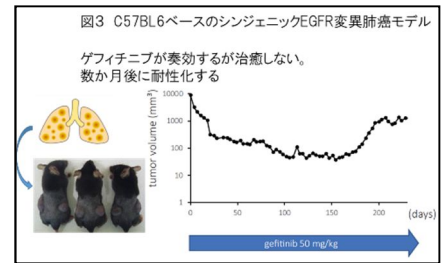
1. 「persister」がん細胞とその腫瘍微小環境に臨床応用可能な治療標的がないか?
2. EGFR-TKIと新規標的の阻害による併用療法によって完全寛解、治癒が期待できないか?

2. 研究の目的

- 1) 根治の妨げとなっている「persister」がん細胞の生存戦略をin vivoで評価するため、シンジェニックマウスモデルを用いて遺伝子発現、タンパク発現を包括的に評価する。
 - 2) 「persister」がん細胞の生存に腫瘍微小環境がどのように関わっているかを評価する。
 - 3) 「persister」がん細胞の生存に関わる分子およびその阻害薬を探索する。
 - 4) 「persister」がん細胞の病態に沿った阻害薬の効果を遺伝子改変マウスモデルで検証する。
- 1)~4)を元に、EGFR-TKIによる初回治療により、深い寛解、治癒を目指す新規治療の臨床開発を目指すことを本研究の目的とした

3. 研究の方法

本研究の遂行にあたり、私たちは、SP-C プロモーターによりマウス 2 型肺胞上皮細胞に EGFR 変異を特異的に発現させ、EGFR 変異肺癌が自然発生するマウスモデル 2 系統 (マウス Egfr ex19delion およびヒト EGFR L858R) を作成している (Ohashi Cancer Sci 2008、Ohashi Cancer Res 2009、特許第 5255216 号)。肺にびまん性に腫瘍が発生する点が実際のヒト肺癌と異なるため、この肺癌マウスモデルの改良、新規マウスモデルを樹立した。マウス肺腫瘍を摘出して他の C57BL/6 マウスの皮下、腹腔投与による腹膜、尾静脈投与による肺などへの腫瘍生着を確認した。また繰り返しその腫瘍を継代できることも確認した (図 3) (Higo, Ohashi, Kiura Lung Cancer 2019)。このモデルは、単一部位から進展するため、治療効果の判定がしやすいといった利点も有する。また移植した腫瘍は EGFR-TKI の感受性を保持しており、EGFR-TKI 投与にて縮小するが、完全寛解、治癒しない (図 3)。一定期間の治療後に再燃、耐性化し、興味深いことに EGFR T790M といった 2 次耐性変異が発生することも確認している。しかもヒト肺癌と同様にオシメルチニブが EGFR T790M を有する耐性腫瘍を抑制し、また耐性化することも確認している。 (Higo, Ohashi, Kiura Lung Cancer 2019)。以上より臨床経過を比較的良好に反映するシンジエニックモデルと考えた。



我々の新規肺癌マウスモデルは以下 1)-6) の重要な特徴をもつ。

- 1) マウス 2 型肺胞上皮由来の EGFR シグナルに依存した肺腫瘍である。
- 2) 免疫能が保持された C57BL/6 に生着、進展する。
- 3) ヒト肺癌と同様に EGFR-TKI により腫瘍縮小するが、完全寛解には至らず残存する。
= 「persister」がん細胞マウスモデル。
- 4) ヒト肺癌と同様に数か月後に耐性化、2 次的 EGFR 変異が出現する
- 5) ヒト肺癌と同様にオシメルチニブは、2 次的体制変異を有する耐性腫瘍に奏効する。
- 6) ヒト肺癌と同様にオシメルチニブも数か月後に耐性化する。

この新規モデルを用いて、「persister」がん細胞と腫瘍微小環境の病態評価を行った。

図 4 に示すように、腫瘍を移植、腫瘍量 300mm³ にて EGFR-TKI ゲフィチニブまたはオシメルチニブの投与を開始する。治療前、腫瘍縮小の途中の Day4、および効果が最大化しプラトーとなる Day10 の 3 ポイントでサンプルを採取し、DNA、RNA、タンパク抽出および免疫染色用に組織ブロックを作製した。なお、EGFR-TKI を中断すると腫瘍は速やかに再燃し、治癒状態は得られない。

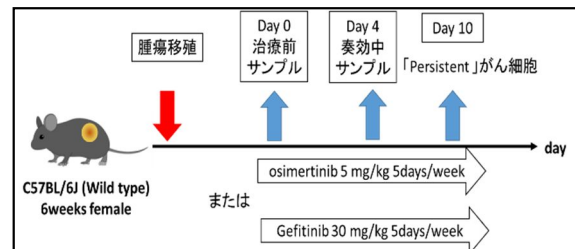


図 4 「persister」がん細胞の採取

1 RNA および全ゲノムシーケンシング解析 (図 5)

岡山大学バイオバンクおよび研究協力者ドイツゲルン大学 Sos 教授と共同し次世代シーケンサー (NGS) で RNA-sequencing を行った。

2 「persister」がん細胞と腫瘍微小環境の検討

RNA-sequencing の結果を踏まえ免疫染色、フローサイトメトリーにより、間質に存在する細胞の種類を同定

3 治療標的候補の絞り込み

3-1 NGS データのバイオインフォマティクス解析

1、2 で得られたデータを統合して、「persister」がん細胞および腫瘍微小環境を形成する間質細胞などにおける治療標的を検討

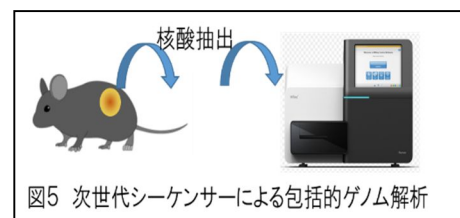


図 5 次世代シーケンサーによる包括的ゲノム解析

4 「persister」がん細胞マウスモデルを用いた「persister」がん細胞の根絶を目指した併用治療の検討

EGFR-TKI と新規阻害薬の併用治療の「persister」がん細胞に対する効果の検証（図6）

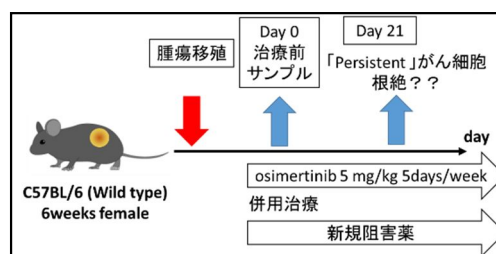


図6 EGFR-TKIと新規阻害薬の併用治療の効果

4 . 研究成果

EGFR 遺伝子改変肺癌マウスモデルの樹立は米国ハーバード大学などより報告されている。しかし彼らはクララ細胞を標的とした CCSP プロモーターを使用しており、2 型肺胞上皮細胞を標的とした私たちのモデルとは腫瘍の起源が根本的に異なる。また、実臨床において EGFR 変異を有する肺癌は免疫チェックポイント阻害薬の効果が乏しいことが問題となっているが、彼らの肺癌モデルは PD-L1 が高発現し、また抗 PD-1 抗体に奏効する(Akabay Cancer Discov 2013)。そのためヒト肺癌を適切に反映するモデルとは言えない可能性がある。申請者らのモデルは、2 型肺胞上皮由来の肺癌が発生する。また EGFR-TKI にて EGFR T790M を有する耐性腫瘍を誘導する。さらに重要なことに EGFR 肺癌細胞上に PD-L1 の発現がなく、抗 PD-1 抗体の効果も乏しいなど実際の臨床を反映していることがわかった (Nishii, Ohashi JCA-AACR2021 Cancer Immunology Research provisionally accepted)。

EGFR 遺伝子改変動物を使って「persister」がん細胞の病態、また腫瘍微小環境の相互関係に着目した研究の報告は現在においても十分なされていない。本研究により 1) EGFR 肺癌において EGFR シグナルが腫瘍免疫抑制的な微小環境を誘導すること、2) EGFR-TKI による EGFR シグナル阻害によって CD8 陽性 T 細胞による抗腫瘍免疫が誘導されること、3) 一方で新たな腫瘍免疫抑制的な因子が誘導され EGFR-TKI が誘導する抗腫瘍免疫活性は限定的となること、また および EGFR-TKI 休薬によりその抑制的因子は減少すること、4) EGFR-TKI と抗 PD-1 抗体または抗 VEGFR-2 抗体の同時併用は抗腫瘍免疫を十分に活性化させないが、EGFR-TKI 投与後に逐次的に PD-1/VEGFR2 阻害薬の併用投与を行うことにより EGFR-TKI が誘導する抗腫瘍免疫を活性化させることを示した(Nishii, Ohashi JCA-AACR2021, Cancer Immunology Research provisionally accepted)。

また、ドイツケルン大学との共同研究により EGFR シグナル阻害により MAPK/IRF1 経路が誘導する炎症反応が、腫瘍微小環境の改変、治療抵抗性に関与すること、及び EGFR-TKI と RIG-1 アゴニストである IVT4 の併用により腫瘍免疫がより賦活化、抗腫瘍効果の増強が得られることを報告した (Brägelmann J, Ohashi K, Sos ML Nature Communication 2021)。

その他、RNA-sequencing など踏まえ、本研究をさらに発展させるため「persister」がん細胞および腫瘍微小環境におけるより優れた治療標的について検証を行う計画である。

EGFR 変異陽性肺癌は、非喫煙者肺癌の半数以上を占める重要な疾患である。日本人を含む東アジア人に特に発生頻度が高いこと、また若年発症例も多く認めることもあり、臨床的にも社会的にも重要性が高い。そのため、本研究により、EGFR-TKI の治療効果の最大化、完全寛解を目指した治療戦略の発展は、社会への貢献に大きく繋がる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nishii K, Ohashi K, Tamura T, Ninomiya K, Matsubara T, Senoo S, Kano H, Watanabe H, Oda N, Makimoto G, Higo H, Kato Y, Ninomiya T, Kubo T, Yamamoto H, Tomida S, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Detection of epidermal growth factor receptor mutations in exhaled breath condensate using droplet digital polymerase chain reaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12256.	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 Ohashi K, Ninomiya K, Yoshioka H, Bessho A, Shibayama T, Aoe K, Ishikawa N, Kozuki T, Kawai H, Kuyama S, Miyoshi S, Fujitaka K, Obata H, Tsubata Y, Awaya Y, Inoue M, Inoue K, Horita N, Yanai H, Hotta K, Kiura K.	4. 巻 150
2. 論文標題 Impact of HER2 expression on EGFR-TKI treatment outcomes in lung tumors harboring EGFR mutations: A HER2-CS study subset analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer.	6. 最初と最後の頁 83-89.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2020.09.024.	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 Kayatani H, Ohashi K, Ninomiya K, Makimoto G, Nishii K, Higo H, Watanabe H, Kano H, Kato Y, Ninomiya T, Kubo T, Rai K, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 532(3)
2. 論文標題 Beneficial effect of erlotinib and trastuzumab emtansine combination in lung tumors harboring EGFR mutations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 341-346.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.055.	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 Itano J, Higo H, Ohashi K, Makimoto G, Nishii K, Hotta K, Miyahara N, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 59(6)
2. 論文標題 Successful Re-administration of Osimertinib in Osimertinib-induced Interstitial Lung Disease with an Organizing Pneumonia Pattern: A Case Report and Literature Review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 823-828.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3689-19.	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 Higo H, Ohashi K, Makimoto G, Nishii K, Kudo K, Kayatani H, Watanabe H, Kano H, Ninomiya K, Hotta K, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 136
2. 論文標題 EGFR-TKI acquired resistance in lung cancers harboring EGFR mutations in immunocompetent C57BL/6J mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 86-93.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2019.08.019.	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 Makimoto G, Ohashi K, Tomida S, Nishii K, Matsubara T, Kayatani H, Higo H, Ninomiya K, Sato A, Watanabe H, Kano H, Ninomiya T, Kubo T, Rai K, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Takata M, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid Acquisition of Alectinib Resistance in ALK-Positive Lung Cancer With High Tumor Mutation Burden.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Oncol.	6. 最初と最後の頁 2009-2018.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2019.07.017.	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 Watanabe H, Ohashi K, Nishii K, Seike K, Makimoto G, Hotta K, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 58(20)
2. 論文標題 A Long-term Response to Nivolumab in a Case of PD-L1-negative Lung Adenocarcinoma with an EGFR Mutation and Surrounding PD-L1-positive Tumor-associated Macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 3033-3037.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2875-19.	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 Makimoto G, Ohashi K, Senoo S, Hotta K, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 58(11):
2. 論文標題 Beneficial Effect of Osimertinib Readministration in Non-small-cell Lung Cancer Harboring an Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation with a History of Acquired Resistance to Osimertinib.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 1625-1627.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2152-18.	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 Bragelmann J, Lorenz C, Borchmann S, Nishii K, et al, Siveke JT, Ohashi K, Schlee M, Sos ML.	4. 巻 12
2. 論文標題 MAPK-pathway inhibition mediates inflammatory reprogramming and sensitizes tumors to targeted activation of innate immunity sensor RIG-I.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25728-8.	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 該当する

1. 著者名 Nishii K, Ohashi K, Watanabe H, Makimoto G, Nakasuka T, Higo H, Ninomiya K, Kato Y, Kubo T, Rai K, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Triple therapy with osimertinib, bevacizumab and cetuximab in EGFR-mutant lung cancer with HIF-1 /TGF- expression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12900.	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大川祥, 大橋圭明, 原尚史, 西井和也, 中須賀崇匡, 平生敦子, 安東千裕, 狩野裕久, 渡邊洋美, 二宮貴一郎, 加藤有加, 久保寿夫, 頼冠名, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 前田嘉信, 木浦勝行
2. 発表標題 Egfr改变肺癌マウスモデルを用いたpersisterがん細胞に対する根治的薬物療法の開発
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西井和也, 大橋圭明, 中須賀崇匡, 平生敦子, 大川祥, 渡邊洋美, 狩野裕久, 原尚史, 安東千裕, 二宮貴一郎, 加藤有加, 二宮崇, 久保寿夫, 頼冠名, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, (鶴殿平一郎), 前田嘉信, 木浦勝行
2. 発表標題 Egfr改变肺癌マウスモデルを用いたEGFR-TKI、抗VEGFR-2抗体と抗PD-1抗体併用療法の検討
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuya Nishii, Kadoaki Ohashi, Kiichiro Ninomiya, Go Makimoto, Hiromi Watanabe, Hirohisa Kano, Naofumi Hara, Heiichiro Uono and Katsuyuki Kiura
2. 発表標題 Tumor immunoediting in a lung cancer mouse model harboring EGFR mutations
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kadoaki Ohashi, Go Makimoto, Shuta Tomida, Kazuya Nishii, Shinichi Toyooka and Katsuyuki Kiura
2. 発表標題 Rapid acquired resistance to alectinib in ALK-positive lung cancers with high tumor mutation burden
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Nishii, Kadoaki Ohashi, Shuta Tomida, et al, Shinichi Toyooka, Heiichiro Uono, Yoshinobu Maeda, Katsuyuki Kiura
2. 発表標題 Novel combined immunotherapy with EGFR-TKI followed by dual blockade of PD-1 and VEGFR2 in lung cancer harboring Egfr mutation.
3. 学会等名 1st JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference (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	木浦 勝行 (Kiura Katsuyuki) (10243502)	岡山大学・大学病院・教授 (15301)	

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			
ドイツ	University of Cologne			