

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16813

研究課題名(和文) MET exon14遺伝子変異肺癌に対する治療戦略の新展開

研究課題名(英文) Development of new treatment strategy for lung cancer harboring MET exon14 mutation

研究代表者

藤野 智大 (Fujino, Toshio)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90813981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)： MET exon14 skipping mutationを有する非小細胞肺癌患者に対して2020年に2種類のMET-TKI(capatinibとtepotinib)の使用が保険承認された。しかし、一部の患者は、これら薬剤に対して初期耐性を示したり、奏効した患者においてもいずれ必ず耐性を獲得することが問題である。

我々は、capatinibとtepotinibに対する耐性二次変異を克服しうる薬剤として、foretinibが有用である可能性を明らかとした。また、MET遺伝子以外の癌関連遺伝子のheterogeneityがMET-TKIの効果に影響を及ぼす可能性を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見により、MET exon14 skipping変異を伴う肺癌患者において、初回に投与されたMET阻害剤に耐性を来した場合でも、再び有効な治療を受ける機会が提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Two MET-TKIs (capatinib and tepotinib) were approved in 2020 for use in non-small cell lung cancer with MET exon14 skipping mutation. However, there is a problem that some patients show primary resistance to these drugs and that even responders will eventually develop resistance to these drugs.

We have shown that foretinib may be useful for overcoming on-target resistance mutations to capatinib and tepotinib. We also found that heterogeneity of cancer-related genes besides MET gene may influence the efficacy of MET-TKI.

研究分野：肺癌の分子標的治療

キーワード：非小細胞肺癌 分子標的治療 MET遺伝子変異 獲得耐性変異

1. 研究開始当初の背景

MET exon14 skipping mutation (MET Δ ex14)を伴う非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer: NSCLC)に対して 2020 年に 2 種類の MET-TKI の使用が日本と米国で保険承認された。本遺伝子変異は、NSCLC の約 3%に出現するとされ、日本と米国のみで毎年約 6500 人の新規肺癌患者が MET Δ ex14 を有すると予測される。MET-TKI を含む分子標的薬による治療では、一旦は奏効してもいずれ耐性を必ず獲得することが問題である。そのため、これら患者に有効な治療法を提供するためには、耐性機序の解析、及びそれらを克服しうる薬剤の開発が重要である。

我々のグループは、以前よりこの MET Δ ex14 陽性肺癌に着目してきた。2016-19 年度の科学研究費助成事業(16H05433)による研究では、我々が世界で初めて樹立に成功した METex14 を有する人工腫瘍細胞株を用いて、8 種類の MET-TKI に対する感受性と耐性メカニズムを網羅的に解析した結果を報告した(Fujino, et al. J Thorac Oncol. 2019)。上記では、MET-TKI の二次的耐性機序として、MET チロシンキナーゼの活性化状態に結合する type I MET-TKI では、MET D1228 と Y1230 アミノ酸残基に二次変異が共通して高頻度に出現すること、そして、これら変異は、MET の不活性化状態に結合する type II MET-TKI には感受性が保持されていることを報告し、type I から type II MET-TKI にスイッチすることで耐性を克服できる可能性を提唱した。しかし、その後の臨床報告では、MET D1228 と Y1230 のうち、特に D1228 における二次変異に対しては、当時臨床開発が進められていた type II MET-TKI では効果が不十分である可能性が示唆された。

また、MET-TKI の初回投与時における客観的奏効率は、44-68%と報告されており、これらは、MET-TKI に初期から耐性を示す患者や反応性が乏しい患者が約半数近く存在することを示唆している。この原因の仮説の一つとして、MET exon 14 skipping 変異の分布、MET 遺伝子の copy 数変化や遺伝子発現、Co-driver 遺伝子変異の存在に Heterogeneity が存在するために、MET-TKI への感受性に影響を与える可能性が考えられた。しかし、METex14 変異肺癌における tumor heterogeneity については当時十分に理解されていなかった。

2. 研究の目的

MET Δ ex14 陽性の肺癌に対して、①タイプ I MET-TKI に対する主要な二次的耐性変異である MET D1228 と Y1230 アミノ酸残基における全ての変異に対して活性を示す薬剤を明らかにすること、そして、②MET Δ ex14 肺癌における Inter and Intra tumor heterogeneity を解析し、MET 阻害剤の効果に影響を与える因子を探索することで、MET Δ ex14 陽性非小細胞肺癌の前臨床段階における基礎的知見を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Type I MET-TKI に対する二次的耐性機序の克服に関する研究

① ドラッグライブラリーを用いた薬剤をスクリーニング

文部科学省新学術領域研究より提供された分子標的薬ライブラリーに MET 阻害剤を含むレセプター型チロシンキナーゼ阻害剤を約 30 種加えた合計 300 種類の薬剤から MET の耐性二次変異に活性を示す薬剤をスクリーニングした。

② 候補薬剤の検証

上記スクリーニングで得られた 4 種の type II MET-TKI (altiratinib, CEP-40783, foretinib, sitravatinib)、臨床開発が進行中の type II MET-TKI 2 種(cabozantinib,

merestinib)、保険承認済みの type I MET-TKI 2 種 (capmatinib, tepotinib)、合計 8 種の MET-TKI を、MET D1228 もしくは Y1230 アミノ酸残基に二次変異を有する Ba/F3 細胞と Hs746t 細胞を使用して、細胞増殖阻害試験を行い、IC₅₀を算出して比較検討した。

③ In vivo における効果の確認

候補薬剤のうち、第 I/II 相臨床試験ですでに安全性が確認されている foretinib の効果を In vivo で検証した。

④ Computational method を用いた解析

Foretinib が D1228 アミノ酸残基における変異に対して活性が保持されている要因を Docking simulation により検討した。

(2) METΔex14 陽性肺癌における Inter and Intra tumor heterogeneity に関する研究

① 肺肉腫様癌症例における METΔex14 症例のスクリーニング

NSCLC の中でも特に METΔex14 の出現頻度が高いとされる肺肉腫様癌(Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma: PSC)を解析対象とした。PSC と病理学的に診断された外科切除症例および剖検症例より、MET exon 14 skipping 変異の有無を RT-PCR 法で検索した。

② METΔex14 陽性の PSC における heterogeneity の解析

METΔex14 を認めた症例において、外科切除例では組織亜型毎、剖検例では、非癌部、主病変、転移病変よりそれぞれ RNA/DNA を抽出。これら検体を用い、MET 変異の有無(RT-PCR)、MET gene copy number (real time RT-PCR)と MET gene expression (qRT-PCR)の解析、および 409 の癌関連遺伝子における変異(SNV, Insertion, Deletion)と Copy number variation について遺伝子パネル検査を用いて腫瘍内(Intra)および腫瘍間(Inter)の Heterogeneity を解析した。

4. 研究成果

(1) Type I MET-TKI に対する二次的耐性機序の克服に関する研究

IC ₅₀ (nM)	Type I		Type II						
	capmatinib	tepotinib	altiratinib	CEP-40783	foretinib	sitravatinib	cabozantinib	merestinib	
MET WT + IL3	>1000	>1000	>1000	>1000	906	>1000	>1000	452	
Exon 14 skip	0.4	3.5	3.6	1.1	3.2	3.6	11.4	3.7	
D1228	A	>1000	>1000	92	32	11	98	295	99
	E	50	>1000	10	10	1.4	14	37	14
	G	348	>1000	32	31	10	49	90	34
	H	>1000	>1000	11	11	10	35	103	33
	N	>1000	>1000	12	12	11	37	37	34
	V	>1000	>1000	18	3.6	1.5	19	110	39
	Y	402	>1000	37	11	12	98	451	119
Y1230	C	>1000	>1000	1.3	4.1	0.4	10	18	10
	D	>1000	>1000	3.7	10	0.4	10	31	4.3
	H	470	>1000	4.6	12	3.6	32	18	11
	N	>1000	>1000	11	35	3.6	33	36	4.1
	S	>1000	>1000	0.2	4	0.1	0.8	32	12

IC₅₀ ≤ 50nM 50 < IC₅₀ < 200nM IC₅₀ ≥ 200nM

図 1 : Hit 薬剤の各 MET 変異に対する IC₅₀ のまとめ

ドラッグライブラリーを用いたスクリーニング、及び細胞増殖阻害試験の結果より CEP-40783 と foretinib の 2 種類が MET D1228 と Y1230 のいずれの二次変異に対して IC₅₀ が 50nM 以下と強い阻害活性を有することが発見した。(図 1)

第一相臨床試験ですでに安全性が確認されている foretinib について、In vivo でも検証したところ、やはり強い抗腫瘍活性を有することが確認された。(図 2)

分子動力学(MD;

molecular dynamics)シミュレーションにより、D1228 コドンに変異が起きると、チロシンキナーゼ内の D1228 を含む activation loop と呼ばれる領域が α-helix 構造を形成し、drug binding pocket を狭小化するために、cabozantinib, merestinib 等への感受性が低下する可能性を示した (図 3)。

上記の結果から、Type I MET-TKI に対する獲得耐性として二次的変異(D1228X または Y1230X)が生じた場合に、foretinib は有用な後治療薬となる可能性が示唆された。

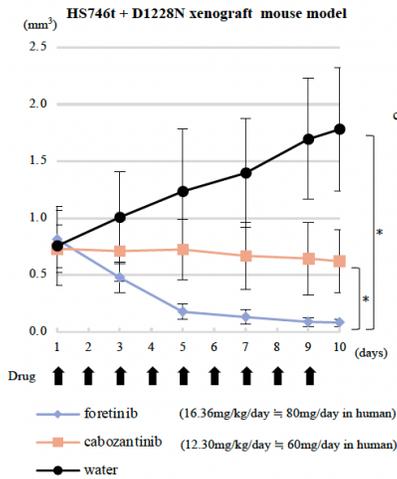


図 2 : In vivo での抗腫瘍活性の評価

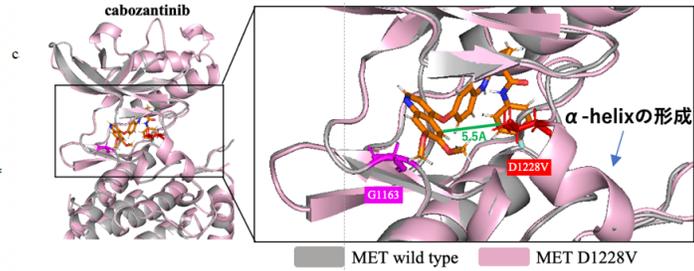


図 3 : MD シミュレーションによる解析

(2) MET Δ ex14 陽性肺癌における Inter and Intra tumor heterogeneity に関する研究

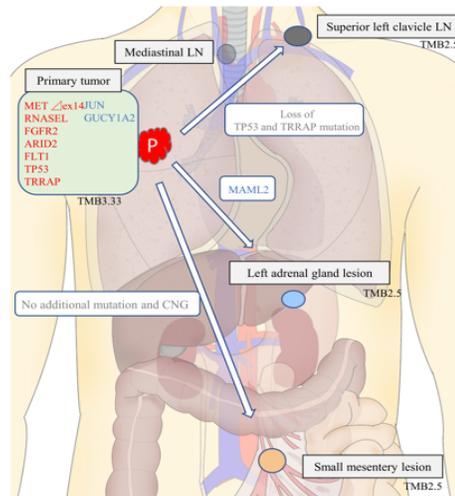


図 4 : 剖検例の転移病巣毎の遺伝子変異解析

解析症例は少ないものの、日本人においてもPSCにおいてはMET Δ ex14が高頻度(17%, 4/23)に出現することを明らかとした。そして、MET Δ ex14は、腫瘍内の組織亜型、いずれの転移病巣にも均一に分布する遺伝子変異であることを初めて明らかとした。一方で、転移病巣間、ならびに腫瘍内の組織亜型間では、MET遺伝子以外の癌関連遺伝子にheterogeneityがあることを見出し、特に組織亜型間に癌関連遺伝子のcopy numberに非常にheterogeneityがあることを発見した(図4)。これらの結果より、MET遺伝子そのものの変化より共存する癌関連遺伝子の腫瘍内および腫瘍間の多様性(Intra and Inter-tumor heterogeneity)がMET阻害剤の効果に影響を与える可能性を報告した。(Fujino, et al. Clin Lung Cancer. 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujino Toshio, Suda Kenichi, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Lung Cancer with MET exon 14 Skipping Mutation: Genetic Feature, Current Treatments, and Future Challenges	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung Cancer: Targets and Therapy	6. 最初と最後の頁 35 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/lctt.s269307	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 Fujino Toshio, Suda Kenichi, Sakai Kazuko, Murakami Isao, Shimizu Shigeki, Ohara Shuta, Koga Takamasa, Hamada Akira, Soh Junichi, Nishio Kazuto, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Intra-tumor and Inter-tumor Heterogeneity in MET Exon 14 Skipping Mutations and Co-mutations in Pulmonary Pleomorphic Carcinomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 e185 ~ e195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clcc.2021.09.005	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 Fujino Toshio, Kobayashi Yoshihisa, Suda Kenichi, Koga Takamasa, Nishino Masaya, Ohara Shuta, Chiba Masato, Shimoji Masaki, Tomizawa Kenji, Takemoto Toshiki, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In?Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2019.06.023	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 Fujino Toshio, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Acquired Resistance Mechanism for MET Tyrosine Kinase Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 100134 ~ 100134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtocrr.2020.100134	査読の有無 無
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 Toshio Fujino, Kenichi Suda, Tetsuya Mitsudomi	4. 巻 25
2. 論文標題 Emerging MET tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Emerging Drugs	6. 最初と最後の頁 229-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14728214.2020.1791821	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11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Toshio Fujino, Kenichi Suda and Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Treatment strategy of lung cancer with MET, NTRK and BRAF gene aberrations: Insights from in vitro and clinical data
3. 学会等名 2022 the Japanese Society of Medical Oncology Annual Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshio Fujino, Yoshihisa Kobayashi, Kenichi Suda and Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Establishment of treatment strategy for lung cancer with MET exon 14 skipping mutation
3. 学会等名 The 3rd International Cancer Research Symposium of Training Plan for Oncology Professionals (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野 智大, 須田 健一, 小林祥久, 古賀 教将, 西野 将矢, 小原 秀太, 濱田 顕, 千葉 真人, 武本 智樹, 宗 淳一, 光富 徹哉
2. 発表標題 MET TKI耐性に関わる二次的変異の検索 -MET exon 14 skipping Ba/F3 モデルを用いた検討 -
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshio Fujino, Yoshihisa Kobayashi, Kenichi Suda, Masaya Nishino, Takamasa Koga, Shuta Ohara, Akira Hamada, Masato Chiba, Toshiki Takemoto, Junichi Soh and Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Comprehensive analysis of secondary resistant mutations to MET-TKIs for MET exon 14 skipping in vitro
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshio Fujino, Kenichi Suda and Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Dysregulation of MET: its significance in carcinogenesis and treatment of lung cancer
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japan Lung Cancer Society (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤野智大、須田健一、小原秀太、濱田顕、千葉真人、下治正樹、武本智樹、宗淳一、光富徹哉
2. 発表標題 MET exon 14 skipping変異肺癌におけるType I MET-TKI耐性二次的変異とその克服
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 Toshio Fujino, Kenichi Suda and Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Treatment strategy of lung cancer with MET, NTRK and BRAF gene aberrations: Insights from in vitro and clinical data
3. 学会等名 2022 the Japanese Society of Medical Oncology Annual Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤野智大
2. 発表標題 MET遺伝子変異陽性肺癌の病態と MET-TKIに対する感受性と耐性機序
3. 学会等名 第61回 日本肺癌学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野智大、須田 健一、坂井和子、清水重喜、村上功、小原秀太、古賀教将、西野将矢、濱田顕、千葉真人、武本智樹、宗淳一、西尾和人、光富徹哉
2. 発表標題 MET exon14 skipping変異陽性肺多形癌における intra-およびinter-tumor heterogeneityの検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshio Fujino
2. 発表標題 Comprehensive analysis of secondary mutation as resistance mechanism to seven MET-TKIs for MET exon 14 skipping in vitro
3. 学会等名 20th World Conference on Lung Cancer（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野 智大
2. 発表標題 MET exon14 skipping変異陽性多形癌におけるInter-tumor Heterogeneityの検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤野 智大, 須田 健一, 光富 徹哉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 8
3. 書名 呼吸器ジャーナル	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タイプI型抗がん剤に耐性を獲得した肺癌用治療薬	発明者 藤野智大、光富徹哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、KU220115PCT	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------