

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08191

研究課題名(和文) EGFR遺伝子変異の代謝特性に基づく治療抵抗性の克服

研究課題名(英文) Overcoming treatment resistance based on metabolic properties of EGFR gene mutations

研究代表者

瀧川 奈義夫 (Takigawa, Nagio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々のEGFR遺伝子変異細胞株をマルチオミクス解析で比較し、それぞれのEGFR変異に特異的な治療戦略の基盤となる蛋白、遺伝子、および代謝経路を見出した。EGFR阻害薬耐性においてはグルタミン酸輸送に関与する遺伝子が高発現し、その阻害薬あるいはグルタミナーゼ阻害薬による耐性克服の可能性が示唆された。EGFR阻害薬の曝露により免疫関連シグナルやDNA代謝過程の変化が認められた。また、ALK阻害薬耐性においては活性酸素を分解する酵素が高発現しており、この酵素の阻害により耐性克服の可能性が示唆された。これらの代謝特性を含む新たな知見が分子標的薬の更なる治療効果に結びつくことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR変異あるいはALK変異を有する進行非小細胞肺癌は、EGFRあるいはALKのチロシンキナーゼ阻害薬の導入により劇的な効果がもたらされてきたが、治癒に至ることは極めて稀である。EGFR変異の違いによる阻害薬の効果の差や耐性を誘導する機序は不明の部分が多く、それを解明する手法としてプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析、およびシングルセル解析を用いて基礎研究を行った。その結果、グルタチオン、グルタミン、および活性酸素の分解酵素などの新たな標的を発見し、耐性克服のためにそれら阻害薬の有用性を前臨床試験として証明することができた。今後は臨床応用すべく本研究をさらに進めたい。

研究成果の概要(英文)：We compared various EGFR gene mutant cell lines using multi-omics analysis and discovered the proteins, genes, and metabolic pathways that serve as the basis for treatment strategies specific to each EGFR mutation. SLC1A3, which is involved in glutamate transport, is highly expressed in EGFR inhibitor-resistant cells, suggesting the possibility of overcoming resistance with its inhibitor or glutaminase inhibitor. Single cell analysis showed immune-related signal and DNA metabolic changes upon exposure to an EGFR inhibitor. In addition, high SOD1 expression was observed in an ALK-mutant cell line resistant to an ALK inhibitor (alectinib), suggesting that this inhibition may overcome resistance. It is hoped that these findings would lead to further therapeutic effects of molecular targeted drugs.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR ALK 薬剤耐性 代謝

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドライバーオンコジンを有する悪性腫瘍は、分子標的薬の登場により劇的な効果がもたらされるようになった。肺腺癌ではその 50~60%に検出されるドライバーオンコジンは活性型 Epidermal growth factor receptor (EGFR) であり、600 種類以上の変異が報告されている。その中でエクソン 19 欠失 (del) とエクソン 21 の L858R 変異が約 90%を占め、EGFR チロシナーゼ阻害薬 (TKI) に高い感受性を示す。しかしながら、大半は約 1 年で増悪するため、新規治療法の開発が精力的に行われてきた。耐性機序の約 60%を占める EGFR の 2 次変異 (T790M) に効果を有する第 3 世代の TKI (オシメルチニブ) が臨床導入されたが、それにも耐性となる 3 次変異 (C797S) が報告された。2018 年にはオシメルチニブの初回治療が可能となったが、耐性変異 (C797S、G724S) が検出され、MET 増幅、融合遺伝子、小細胞癌への形質転化などの新たな耐性も報告されている。これには、遺伝的に均一な細胞からの新たな耐性細胞と、不均一な細胞集団から選択された耐性細胞の増殖というふたつの機序が示されてきた。しかしながら、これらの耐性を誘導する因子については未だ明らかではない。

私たちはこれまでの基礎研究の中で、EGFR 変異シグナルの下流を抑制することで耐性克服を目指してきた。しかしながら臨床応用されたのは、既存の EGFR-TKI と血管新生阻害薬のペバシズマブとの併用のみであり、これも無増悪生存期間の延長は認められたが、治癒には至らない。ニボルマブなどの免疫チェックポイント阻害薬も EGFR 変異肺癌に対しての効果は限定的であり、新規治療法の開発が望まれている。

近年、プロテオーム解析やメタボローム解析により悪性腫瘍の発癌、進行、あるいは治療抵抗性に関する代謝経路が明らかになりつつある。私たちはドライバーオンコジンを有する肺癌の代謝に着目し、マルチオミクス解析により TKI 耐性に関する新規タンパク質および遺伝子もあわせて包括的に検討し、新たな治療法の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

目的は EGFR 変異別の代謝経路を明らかにし、耐性克服のため代謝経路の標的治療を開発することである。まずは、種々の EGFR 変異を有する細胞を用いて変異別の代謝経路を同定する。次に、TKI 感受性細胞と耐性細胞のシングルセル解析を行い、メタボローム解析の結果もあわせ、耐性を誘導するメカニズムを見出す。

3. 研究の方法

EGFR 変異肺腺癌細胞株 (PC-9) とそのオシメルチニブ耐性株 (PC-9/OsmR)、Ba/F3 細胞株の野生型 (wt) および各種変異型 EGFR (del、del+T790M、del+C797S、del+T790M+C797S、L858R、L858R+T790M、L858R+C797S、L858R+T790M+C797S) 導入株とそのオシメルチニブ耐性株 (del/OsmR、L858R/OsmR)、ALK 融合遺伝子肺腺癌細胞株 (ABC-11) とそのアレクチニブ耐性株 (ABC-11/CHR2) を用いて、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、あるいはメタボローム解析を行った。蛋白発現は Western blotting と flow cytometry、RNA 発現は RT-PCR で確認した。シングルセル解析は NovaSeq 6000 により行った。薬剤感受性試験は MTT assay で行い、複数の薬剤あるいは siRNA の併用試験は isobologram と combination index を用いて解析した。

4. 研究成果

1) EGFR エクソン 19 欠失 (del) とエクソン 21 L858R 変異 (L858R) 細胞株の mRNA、蛋白、および代謝物の差をマルチオミクス解析により検討した。プロテオーム解析 (図 1) により、L858R では plastin-2、TKT、PDIA5、および ENO1 の発現上昇、del では EEF1G の発現上昇が認められた。RNA シーケンスでは、del で 25 遺伝子、L858R で 87 遺伝子の増加が認められた (図 2)。Gene Ontology 解析では、クラスター-1 で 113 terms、クラスター-2 で 1338 terms、クラスター-3 で 69 terms に有意な変化が認められた。メタボローム解析では、アミノ酸、アデニル酸、グアニル酸、NADPH、乳酸、ピルビン酸グルコース 6-リン酸、およびリボース 5-リン酸が del と L858R 間で有意に異なることが示された。L858R では GSH が増加していたため (図 3)、L858R を用いてオシメルチニブと GSH 阻害薬である BSO 併用で感受性試験を行ったところ、相乗的な細胞増殖抑制効果が認められた (図 4)。

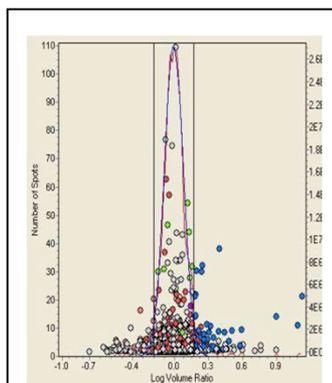


図 1

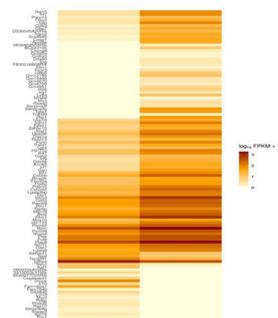


図 2

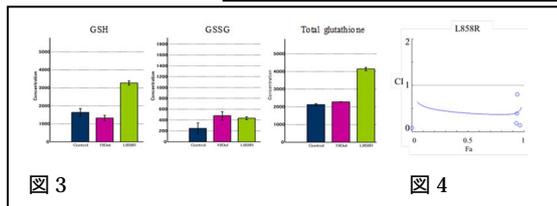


図 3

図 4

2) ALK 陽性肺腺癌細胞株 (ABC-11) とそのアレクチニブ耐性株 (ABC-11/CHR2) のプロテオーム解析 (図 5) により、網羅的に耐性株に高発現する蛋白を探索したところ、superoxide dismutase (SOD) が同定され、Western blotting でも SOD1 高発現が認められた (図 6)。ABC-11/CHR2 において、siSOD1 はアレクチニブの増殖抑制効果を増強し、cleaved PARP の上昇が認められた (図 7)。我々は、ABC-11/CHR2 は MET の発現亢進がアレクチニブ耐性機序のひとつであり、MET 阻害薬としてのクリゾチニブの併用が有効であることを報告しているが、これら 2 剤併用に siSOD1 を加えることでさらに増殖抑制効果は増強した (図 8)。SOD1 阻害薬である LCS-1 は ABC-11/CHR2 においてアレクチニブとは相乗的に細胞増殖抑制効果を示した。

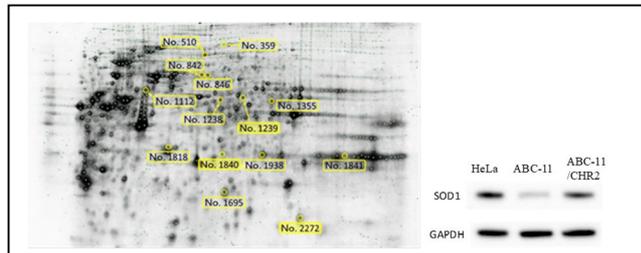


図 5

図 6

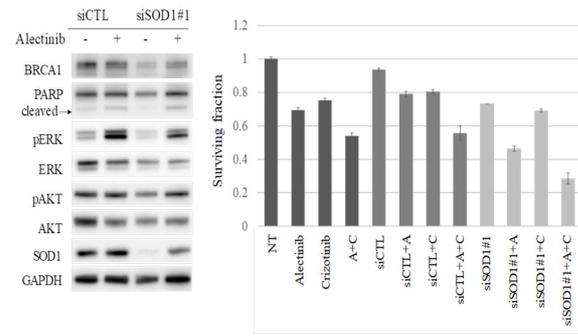


図 7

図 8

3) マイクロアレイ解析ではオシメルチニブ耐性株 (PC-9/OsmR) において SLC1A3 の mRNA が最も増加しており、それを PCR で確認した (図 9)。SLC1A3 蛋白も高発現であり、siSLC1A3 との併用によりオシメルチニブ感受性は回復した (図 10)。SLC1A3 はグルタミン酸の輸送において機能するため、グルタミンアーゼ阻害薬 (CB-839) または SLC1A3 阻害薬 (TFB-TBOA) の併用により高感受性となった。また、メタボローム解析により、Ba/F3 のオシメルチニブ耐性株 (del/OsmR) は del および wt よりもグルタミンとグルタミン酸が有意に多く (図 11)、CB-839 とオシメルチニブの併用により相乗効果をもたらした (図 12)。シングルセル解析では、オシメルチニブの曝露により 12 のクラスターに分類され (図 13)、Gene Ontology 解析では、cell-specific mast cell および DNA metabolic process (図 13) がそれぞれクラスター 1 (図 14) と 12 (図 15) の最上位に認められた。

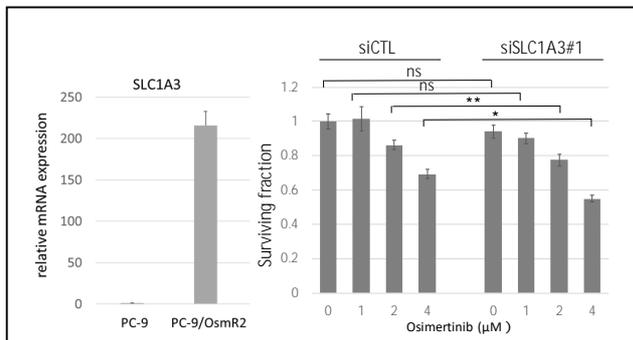


図 9

図 10

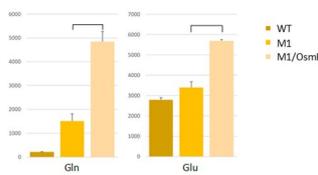


図 11

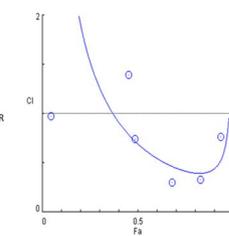


図 12

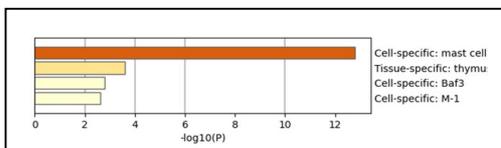


図 14

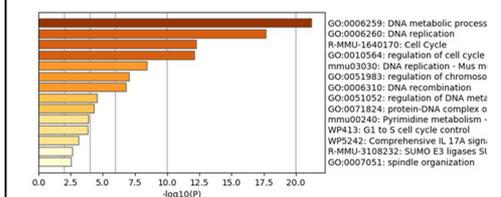


図 15

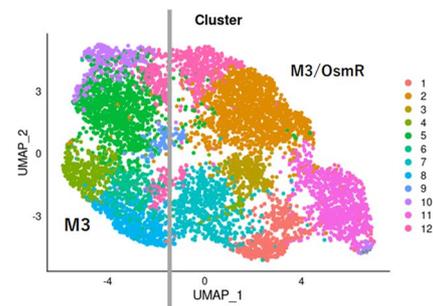


図 13

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ochi Nobuaki, Takeyama Masami, Miyake Noriko, Fuchigami Maki, Yamane Hiromichi, Fukazawa Takuya, Nagasaki Yasunari, Kawahara Tatsuyuki, Nakanishi Hidekazu, Takigawa Nagio	4. 巻 424
2. 論文標題 The complexity of EGFR exon 19 deletion and L858R mutant cells as assessed by proteomics, transcriptomics, and metabolomics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113503 ~ 113503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2023.113503	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 Kudo Kenichiro, Nishii Kazuya, Makimoto Go, Ishikawa Nobuhisa, Tsubata Yukari, Kodani Masahiro, Fujimoto Nobukazu, Yamasaki Masahiro, Kubota Tetsuya, Takigawa Nagio, Fujitaka Kazunori, Kanaji Nobuhiro, Shibayama Takuo, Itano Junko, Ando Chihiro, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki	4. 巻 148
2. 論文標題 First and repeat rebiopsy for detecting EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer: CS-Lung-003 prospective observational registry study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1869 ~ 1877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-021-03893-z	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 Nakagawa N, Miyake N, Ochi N, Yamane H, Takeyama M, Nagasaki Y, Ikeda T, Yokota E, Fukazawa T, Nakanishi H, Harada D, Kiura K, Takigawa N.	4. 巻 409
2. 論文標題 Targeting ROR1 in combination with osimertinib in EGFR mutant lung cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112940	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三宅規子、越智宣昭、中川 望、竹山雅美、山根弘路、長崎泰有、岩井美樹、横田悦子、深澤拓也、瀧川奈義夫
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異肺癌におけるROR1標的治療の基礎的検討
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 Nagio Takigawa, Noriko Miyake, Nobuaki Ochi, Masami Takeyama, Hideko Isozaki, Eiki Ichihara, Hiromichi Yamane, Takuya Fukazawa, Yasunari Nagasaki, Tatsuyuki Kawahara, Hidekazu Nakanishi, Katsuyuki Kiura
2. 発表標題 A novel molecular target, superoxide dismutase 1, in ALK inhibitor-resistant lung cancer cells, detected through proteomic analysis
3. 学会等名 American College of CHEST Physician (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅 規子, 越智 宜昭, 竹山 雅美, 磯崎 英子, 市原 英基, 河原 辰由樹, 長崎 泰有, 中西 秀和, 山根 弘路, 木浦 勝行, 瀧川 奈義夫
2. 発表標題 プロテオーム解析により検出したアレクチニブ耐性肺癌細胞株におけるSOD1高発現の意義
3. 学会等名 第61回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 宣昭, 竹山 雅美, 三宅 規子, 山根 弘路, 深澤 拓哉, 長崎 泰有, 河原 辰由樹, 中西 秀和, 瀧川 奈義夫
2. 発表標題 EGFRエクソン19欠乏とエクソン21 L858R 遺伝子変異を有する肺癌細胞株のマルチオミクス解析
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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	越智 宣昭 (Ochi Nobuaki) (80611615)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山根 弘路 (Yamane Hiromichi) (50624897)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	
研究分担者	中西 秀和 (Nakanishi Hidekazu) (50309548)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

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