

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18461

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌におけるEGFR-TKI耐性克服戦略の最適化に関わる研究

研究課題名(英文) T790M-Selective EGFR-TKI Combined with Dasatinib as an Optimal Strategy for Overcoming EGFR-TKI Resistance in T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer

研究代表者

吉田 健史 (YOSHIDA, Takeshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40548632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではEGFR-T790M陽性肺癌細胞株を用いて、ASP8273およびオシメルチニブとSrc阻害薬ダサチニブの併用効果についてin vitroおよびin vivoで検討した。ダサチニブはASP8273およびオシメルチニブとの併用において単剤と比較して相乗的な細胞増殖抑制効果を示しアポトーシスも有意に増加させた。またダサチニブとオシメルチニブの併用はin vivoにおいても単剤と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。ダサチニブはSrcの抑制を介してBcl-xLを低下させアポトーシスを誘導することで、T790M陽性肺癌細胞株において第三世代EGFR-TKIの抗腫瘍効果を増強させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR陽性非小細胞肺癌に対してはEGFR-TKIが著効するがT790M遺伝子による獲得耐性が臨床的な問題となっている。我々は以前の研究でSrcがT790M存在下におけるco-driverとして重要であることを確認した。また本課題において実際にT790M選択的EGFR-TKIとSrc阻害薬ダサチニブの併用効果をT790M陽性非小細胞肺癌細胞株および、これを皮下移植したマウスモデルにおいて証明したことで、本併用療法がEGFR-TKI耐性非小細胞肺癌患者への治療戦略となり得る可能性があり、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of dasatinib combined with the T790M-selective EGFR-TKI ASP8273 or osimertinib in EGFR mutation-positive NSCLC with or T790M mutation. A cell viability assay revealed that dasatinib had synergistic effects with these TKIs in T790M-positive cells and simultaneously inhibited Src, Akt, and Erk, which remained activated upon single-agent treatment. Dasatinib also increased the rate of apoptosis in T790M-positive cells induced by T790M-selective EGFR-TKIs, as determined by the Annexin-V binding assay; this was associated with downregulation of the antiapoptotic Bcl-2 family member Bcl-xL, a finding that was confirmed in mice bearing T790M-positive xenografts. Our results suggest that Bcl-xL plays a key role in the apoptosis resistance of T790M-positive NSCLC, and that dasatinib combined with clinically relevant T790M-selective EGFR-TKIs is potentially effective in overcoming resistance to first-generation EGFR-TKIs in NSCLC patients with acquired T790M.

研究分野：腫瘍内科学

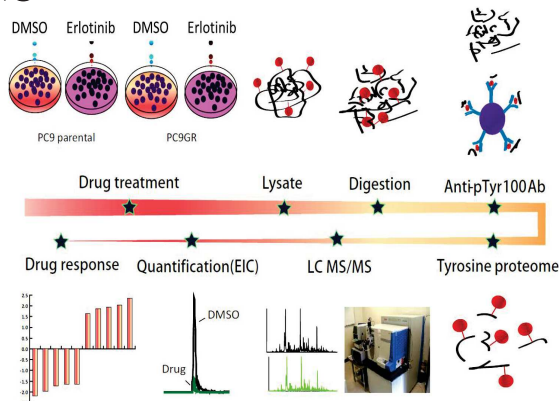
キーワード：非小細胞肺癌 分子標的治療 薬剤耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

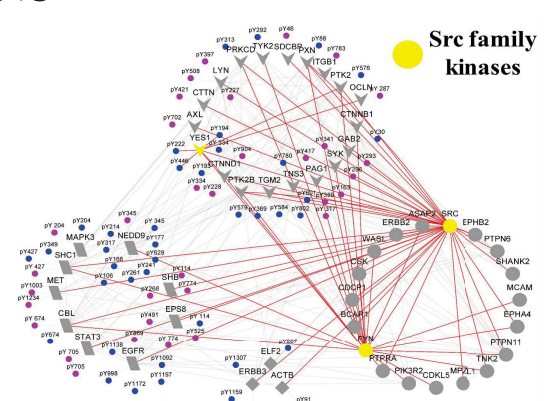
1. 研究開始当初の背景

(1) EGFR 遺伝子変異が陽性である非小細胞肺癌の患者に対して、ゲフィチニブ（イレッサ®）やエルロチニブ（タルセバ®）などの EGFR-TKI は非常に奏効するが、効果は一時的であり腫瘍が再燃する事が大きな臨床的問題となっている。薬剤耐性の原因の多くを T790M 薬剤耐性遺伝子の獲得が占め、この克服のため、アフチニブ（ジオトリフ®）などの第2世代（不可逆的）EGFR-TKI や、日本の製薬企業であるアステラス製薬の治験薬 ASP8273 など第3世代（T790M 選択的）EGFR-TKI の臨床開発が進められ、EGFR-TKI 耐性克服の新たな戦略が模索されてきた。しかしながら薬剤耐性の獲得には複数の要因が影響する事も多く、分子標的薬単剤での耐性克服は容易ではない。事実、アフチニブの T790M 陽性肺癌への効果は基礎研究・臨床試験両者において限定的である事が分かってきており、現在臨床開発が進められている ASP8273 など第3世代（T790M 選択的）EGFR-TKI についても同様の懸念がある。一方で、薬剤耐性に関わる複数の機序を、併用分子標的治療のターゲットとなり得る形で効率的に抽出する事は容易ではない。我々は 2014 年に発表した論文（Yoshida et al. *Clinical Cancer Research* 2014. 20(15):4059-74)において、EGFR 遺伝子変異 Ex19 del 陽性（イレッサ感受性）肺癌細胞株 PC9 へ、イレッサを長期間暴露させる事により T790M 薬剤耐性遺伝子を獲得した PC9GR 肺癌細胞株を樹立し、リン酸化プロテオミクスを用いて EGFR-TKI 耐性に関わるシグナル伝達を網羅的に解析した（図①）。リン酸化プロテオミクスのデータ解析からは、耐性株 PC9GR において Co-driver として重要な役割を担っているシグナルとして Src が抽出された（図②）。我々は複数の T790M 陽性 EGFR-TKI 耐性肺癌患者の腫瘍組織検体においても Src の活性化を証明し、実臨床においても分子標的治療のターゲットとなり得る可能性を示したうえで、第2世代 EGFR-TKI アフチニブ（ジオトリフ®）もしくは第3世代 EGFR-TKI WZ4002 と Src 阻害薬ダサチニブ（スプリセル®）の併用効果を T790M 陽性 EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株（PC9GR, H1975）において確認した。結果としてこれらの併用治療によって細胞増殖抑制やアポトーシスの誘導に関して各単剤と比べ優的な抗腫瘍効果の増強を認めた。本論文で用いた第3世代 EGFR-TKI WZ4002 は臨床開発が行われていないが、我々の結果からは前述の ASP8273 のように現在臨床開発が行われている新規第3世代 EGFR-TKI と Src 阻害薬ダサチニブの併用についても同様に効果的である可能性が高く、EGFR-TKI 耐性の克服への新たな併用治療戦略として検討する必要がある。

図①



図②



- (2) EGFR-TKI 既治療で T790M 陽性となった患者に第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 を投与した場合に生じる薬剤耐性の機序は未だ明らかではない。また今後 ASP8273 を、第 2 世代 EGFR-TKI アファチニブ (ジオトリフ®) と同様に 1 次治療から肺癌治療に用いる可能性を想定し、EGFR 遺伝子変異陽性かつ T790M 陰性 (=EGFR-TKI 耐性を認めない) 患者における ASP8273 耐性の機序についても解析が必要と考えられる。それぞれの場合において T790M 以外の薬剤耐性機序が原因となる事が予想されるため、未知の薬剤耐性獲得機序について必要十分なアプローチを行わねばならない。これまで述べてきたとおり、我々は EGFR-TKI の薬剤耐性細胞モデルの樹立およびリン酸化プロテオミクス等を用いた薬剤耐性機序の解析、その克服戦略の検討について十分な経験を有しており、同様の実験手技を用いて ASP8273 に対する薬剤耐性の機序の解明および耐性克服のための治療戦略の開発を効率的に行う事が可能である。

2. 研究の目的

- (1) T790M 陽性 EGFR-TKI 耐性非小細胞肺癌における薬剤耐性克服戦略として、新規第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 と Src 阻害薬ダサチニブ (スプリセル®) による併用分子標的治療の実用可能性を基礎的に検討し、医師主導治験 (第 I 相試験) を立案する。
- (2) 非小細胞肺癌における新規第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 に対する薬剤耐性の獲得機序を、薬剤耐性肺癌細胞株モデルの樹立やリン酸化プロテオミクスなどを用いて基礎的に解明し、薬剤耐性克服戦略としての新たな併用分子標的治療を臨床応用へつなげる形で提案する。

3. 研究の方法

T790M 耐性遺伝子を持つ肺癌細胞 (PC9GR・H1975 細胞など) を用いて第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 と Src 阻害薬ダサチニブ (スプリセル®) による併用療法の効果を下記の方法により In vitro において検討する。

a. ウェスタンブロッティングを用いたシグナル伝達解析

b. 細胞増殖抑制アッセイ

c. Caspase3 抗体を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイ

次に T790M 耐性遺伝子を持つ肺癌細胞 (PC9GR・H1975 細胞など) をヌードマウスに皮下移植し In vivo においても第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 と Src 阻害薬ダサチニブ (スプリセル®) による併用療法の抗腫瘍効果を確認する。最終的には上記結果を基に第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 と Src 阻害薬ダサチニブ (スプリセル®) による併用分子標的療法の医師主導治験 (第 I 相試験) のプロトコールを作成する。

T790M 耐性遺伝子を持つ肺癌細胞 (PC9GR・H1975 細胞など) に第 3 世代 (T790M 選択的) EGFR-TKI ASP8273 を低濃度から徐々に濃度を上げながら暴露させ、3 か月以上継代を継続する事でこれらの薬剤に対する耐性細胞株を樹立する。また今後非小細胞肺癌の 1 次治療から第 3 世代 EGFR-TKI を用いる事も想定し、EGFR 遺伝子変異 Ex19 陽性かつ T790M 陰性 (EGFR-TKI 獲得耐性なし) である PC9 細胞からも同様の手法を用いて第 3 世代 EGFR-TKI 耐性株を樹立する。樹立した ASP8273 耐性株 (PC9-ASPR, PC9GR-ASPR, H1975 ASPR) はシングルセルクローニングを行った後に、リン酸化プロテオミクス (Yoshida et al. Clinical Cancer Research 2014. 20(15):4059-74) を中心に RTK スクリーニング、次世代シーケンシングなど様々な手法を必要に応じて用いながら耐性機序の網羅的解析を行う。また得られたデータはバイオインフォマティクスの手法を用いて整理する。これらの方法により耐性に関わる分子の候補が見つければ、その分子標的が実際の EGFR-TKI 耐性肺癌患者においても発現しているか否かを、組織検体を用いた免疫染色等を用いて確認する。また、耐性株においてその分子の阻害薬や siRNA などを用いて耐性機序の解明や耐性克服の治療戦略の開発を行う。その場合は

a. ウェスタンブロッティングを用いたシグナル伝達解析

b. 細胞増殖抑制アッセイ

c. Caspase3 抗体を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイ

などの実験手技を用いる。

上記より ASP8273 耐性克服のための有望な併用分子標的療法の候補が発見されれば、樹立した ASP8273 耐性細胞株 (PC9-ASPR, PC9GR-ASPR, H1975 ASPR) をヌードマウスに皮下移植し In vivo において候補の併用分子標的療法の抗腫瘍効果を確認する。In vivo の結果より臨床での実用化が見込める併用分子標的療法については、引き続き医師主導治験 (第 I 相試験) のプロトコールを作成する。

4. 研究成果

EGFR 陽性非小細胞肺癌に対しては EGFR-TKI が著効するが T790M 遺伝子による獲得耐性が臨床的な問題となっている。我々は以前の研究で Src が T790M 存在下における co-driver として重要であることを確認した。本課題では EGFR-T790M 陽性肺癌細胞株を用いて、第三世代 EGFR-TKI である ASP8273 およびオシメルチニブと Src 阻害薬ダサチニブの併用効果について in vitro および in vivo で検討した。ダサチニブは ASP8273 およびオシメルチニブとの併用において単剤と比較して相乗的な細胞増殖抑制効果を示しアポトーシスも有意に増加させた。またダサチニブとオシメルチニブの併用は in vivo においても単剤と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。ダサチニブは Src の抑制を介して Bcl-xL を低下させアポトーシスを誘導することで、T790M 陽性肺癌細胞株において第三世代 EGFR-TKI の抗腫瘍効果を増強させることが示唆された。今後、臨床試験における第三世代 EGFR-TKI と Src 阻害薬の併用効果の検証が待たれる。また我々は T790M 耐性遺伝子を持つ肺癌細胞 (PC9GR・H1975 細胞など) に ASP8273 を低濃度から徐々に濃度を上げながら暴露させ、3 か月以上継代を継続する事でこれらの薬剤に対する耐性細胞株を樹立した。また今後非小細胞肺癌の 1 次治療から第三世代 EGFR-TKI を用いる事も想定し、EGFR 遺伝子変異 Ex19 陽性かつ T790M 陰性 (EGFR-TKI 獲得耐性なし) である PC9 細胞からも同様の手法を用いて第 3 世代 EGFR-TKI 耐性株を樹立した。現在遺伝子やリン酸化蛋白の網羅的解析を行うことで、これらの耐性細胞株の耐性機序の解析が進行中であり、今後の臨床に寄与する成果が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. T790M-Selective EGFR-TKI Combined with Dasatinib as an Optimal Strategy for Overcoming EGFR-TKI Resistance in T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. Watanabe S, Yoshida T, Kawakami H, Takegawa N, Tanizaki J, Hayashi H, Takeda M, Yonesaka K, Tsurutani J, Nakagawa K. Mol Cancer Ther. 2017 Nov;16(11):2563-2571. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0351. Epub 2017 Aug 24. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. 吉田健史, T790M 陽性肺癌細胞株における第三世代 EGFR-TKI と Src 阻害薬ダサチニブの併用効果の検討, 第 58 回 日本肺癌学会学術集会, 2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 渡邊 諭美

ローマ字氏名: (WATANABE, satomi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。