

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201970013

氏名

柴 綾

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ボストン (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

SFN 阻害を基盤とした EGFR 阻害薬獲得耐性克服戦略の解析3. 派遣期間: 平成・令和 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 21 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Massachusetts General Hospital部局名: Cancer Center5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究背景・目的 (1)

EGFR 遺伝子変異は日本人の肺腺癌患者の 50%以上で検出され、ゲフィチニブなどの tyrosine kinase inhibitor (TKI)を用いた EGFR に対する分子標的治療薬は EGFR 変異を有する進行肺腺癌の第一選択薬となっている。しかし、始めは高い著効性を示すものの、多くの場合 1 年から数年で耐性を獲得し再燃する。これまでに肺腺癌の EGFR-TKI に対する薬剤耐性獲得のメカニズムについては、EGFR の二次的変異 (T790M、Kobayashi S, 2005)、MET 増幅 (Engelman JA, 2007)・HGF 過剰発現による MET 活性化 (Yano S, 2008) などの側副経路の活性化、histological transformation (Sequist LV, 2011) 等が報告されている。T790M 変異による耐性獲得症例に対する治療薬として第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブも承認されたが、C797S 変異によるオシメルチニブ耐性もすでに広く知られており根深い問題となっている。すでに獲得した耐性の克服は困難であることから、耐性獲得を予防できる治療戦略を開発することでこの問題を根本から解決できると考えた。

上記の耐性獲得メカニズムのうち、EGFR^{T790M}にはオシメルチニブが、EGFR^{C797S}にはゲフィチニブが、MET 遺伝子増幅は MET 阻害薬 (サボリチニブ等) と EGFR 阻害薬の併用がそれぞれ有効であることが知られているが、単純な併剤療法では後に耐性株が発生することが容易に予想される。そこで、これらの 3 剤を効果的に組み合わせることで、少なくとも最も頻度の高い上記 3 つの耐性獲得メカニズムの発生を予防できると考えた。具体的には、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、サボ

リチニブの3剤を肺腺癌患者に投与する際の投薬用量・スケジュールの最適化を試みる。

耐性獲得は治療前から存在していた非常に少数の変異株が治療によって選別され増加してくる pre-existing パターンと、治療によって治療前にはなかった変異が発生してくる evolution パターンが存在するが、後者の *in vitro* におけるモデル化は非常に困難であることから、pre-existing パターンの治療前の腫瘍をモデル化し、投薬スケジュールの最適化に利用する。EGFR^{T790M}、EGFR^{C797S}、MET 増幅を持つ isogenic なクローンを作製し、親株に極めて少数混ぜて共培養することで pre-existing な耐性株を模倣することを計画した。

isogenic 耐性モデルの樹立

Isogenic 耐性モデルの樹立には、driver oncogene として EGFR エクソン 19 欠損を持ち、EGFR-TKI 感受性である肺腺癌細胞 PC9 を用いた。この細胞にレンチウイルスを用いて EGFR^{T790M} および EGFR^{C797S} を遺伝子導入し、それぞれゲフィチニブ耐性、オシメルチニブ耐性を獲得させた (T790M クローン、C797S クローン)。また、PC9 細胞に長期的に EGFR-TKI の1つである afatinib を投与して樹立した耐性株のうち、MET 増幅が検出されたクローンを MET 増幅クローンとして用いた。一方、MGH において採取された肺腺癌生検材料から当研究室において樹立された細胞株 2 株からも同様に耐性モデルを作製した。T790M と C797S は上記と同様の方法で、MET クローンは実際に患者が MET 増幅を獲得した段階で採取した生検材料から樹立した別の細胞を用いた。薬剤感受性試験を実施し、親株と比較して T790M クローンはゲフィチニブに、C797S クローンはオシメルチニブに対する IC50 が有意に高くなり、期待した耐性を獲得していることを確認した (図 1)。MET クローンは、薬剤感受性試験を行うとゲフィチニブ、オシメルチニブ、サボリチニブの単剤にはいずれにも耐性であったのに対し、ゲフィチニブ+サボリチニブ、オシメルチニブ+サボリチニブの併用に対しては感受性であった (図 1)。これは、このクローン内では EGFR 経路と MET 経路の両者が活性化されているため、片方の阻害剤だけでは十分に細胞増殖を抑制できないためであり、EGFR 阻害剤と MET 阻害剤の併用によって克服できる。今回使用した MET クローンも同様の現象が見られ、MET 増幅による耐性獲得のモデルとして適切な細胞であると考えられる。

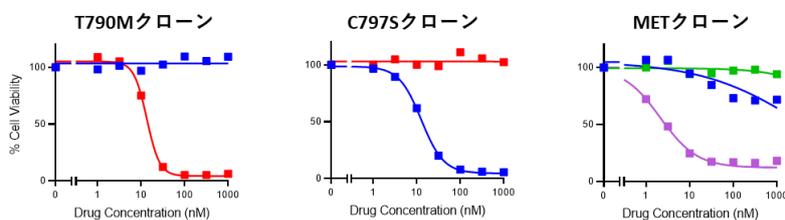


図 1. 各耐性クローンの薬剤感受性試験 (青線：ゲフィチニブ、赤線：オシメルチニブ、緑線：サボリチニブ、紫線：ゲフィチニブ+サボリチニブ)

次に、各クローンを経時的に Live cell imaging system である Incucyte を用いてモニターするために、それぞれに異なる色の蛍光でラベルした。T790M クローンには iRFP713 (near-infrared region : NIR) を、C797S クローンには tagRFP (Orange) を、MET クローンには tagGFP2 (Green) をレンチウイルスにて導入し、安定発現させた。最終的にこれらの3種類のクローン (T790M-NIR クローン、C797S-Orange クローン、MET-Green クローン) を親株に 0.5%の割合で混合し、isogenic resistant model

とした。このモデルを検証するために、上記の比で混合した細胞を 1,000 細胞ずつ 96 穴プレートに播種し、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、サボリチニブの併剤（各 300nM）にて 4 週間にわたり処理し、Incucyte system にて細胞数を観察した。その結果、薬剤投与を開始して 1～7 日目までは無処理群に比べて薬剤投与群（vehicle）の細胞数は有意に低かったが、ゲフィチニブ+サボリチニブ投与群では NIR 陽性細胞が、オシメルチニブ+サボリチニブ投与群では Orange 陽性細胞が、ゲフィチニブ+オシメルチニブ投与群では Green 陽性細胞が観察開始 14 日以降からそれぞれ異なるタイミングではあるが経時的に増加してくることが観察され（図 2）、肺腺癌の EGFR 阻害薬に対する獲得耐性と非常に類似した動きを再現することができた。

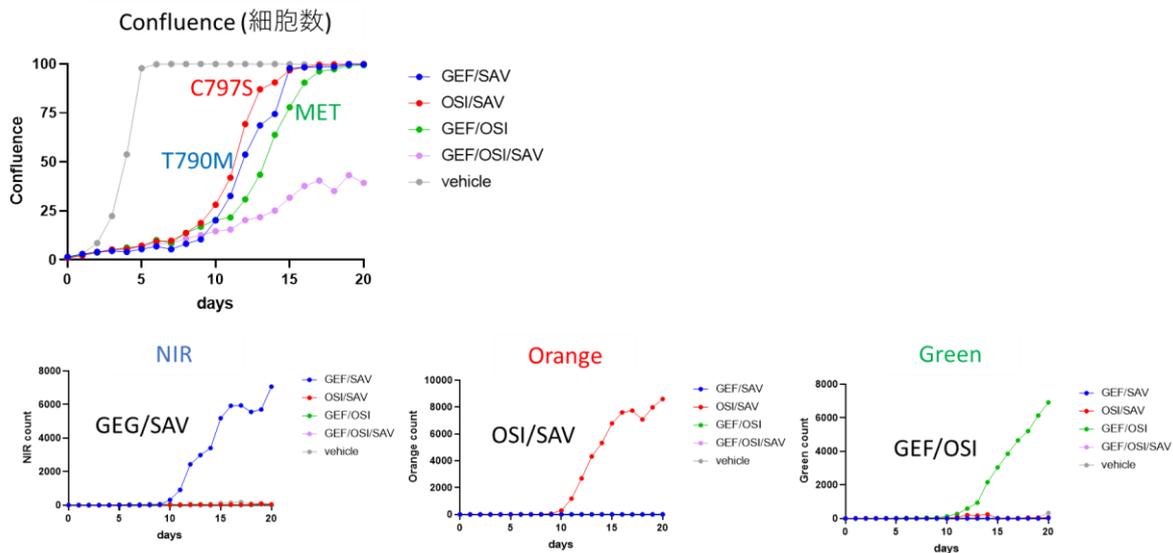


図 2. Isogenic model を長期に薬剤処理した際の、confluence (≒細胞数)、蛍光陽性細胞数の推移。

さらに、このモデル（各クローン 1%で親株に混合）を免疫不全マウス NSG マウスの皮下に移植し、形成した腫瘍を摘出後に解析すると、3 クローンで異なる頻度ではあるが、0.5～3%程度の幅で腫瘍内に残存していることが確認でき、*in vivo* へ応用可能であると示唆された。

投薬スケジュールの最適化

まず、T790M、C797S、MET 増幅を含む耐性獲得メカニズムを図 3 のように想定した。親株は EGFR-TKI のプレッシャーにより殆どが死滅するが、非常に少数の細胞は多くの薬剤に耐性でしかし非常に増殖速度の緩やかな”persister”と呼ばれる状況になる。この状態の細胞からあるきっかけで何らかの遺伝子変異を獲得すると特定の薬剤に対する耐性株となり、高い増殖能力を持つため爆発的に細胞数を増やし、臨床的再発を起こす。親株、persister、耐性株（ここでは T790M、C797S、MET 株に限定）はそれぞれ固有の薬剤感受性や増殖能力を持つため、始めにこれら 5 クローンの薬剤投与下での birth rate と death rate を算出し、各クローンの dynamics をシミュレーションした。

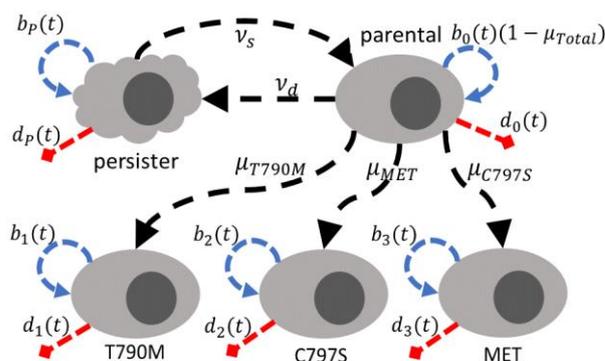


図 3. 薬剤耐性獲得メカニズム *in silico* モデル

この計算のためにまず、5 クローンの薬剤投与下の生細胞数と死細胞数の経時的観察を行った。アポトーシスマーカーである annexin V を蛍光で検出することで死細胞数とし、総細胞数と死細胞数を incuycyte system にて 72 時間モニターした。各薬剤濃度における生細胞数（総細胞数－死細胞数）、死細胞数を経時的にプロットし、その傾きから birth rate と death rate を算出し、この値を図の耐性獲得モデルに適応することで全クローンの dynamics をシミュレーションした。

この *in silico* モデルを用い、(1) で Incuycyte を用いて *in vitro* で行った長期観察と全く同じ条件で各クローンの細胞数の変化を予測すると、*in vitro* での結果と非常に類似した結果となり *in silico* モデルの妥当性が示された。具体的には、ゲフィチニブとオシメルチニブの併剤（各 300nM）を 4 週間にわたって投与する条件で各クローンの dynamics を *in silico* でシミュレーションすると、T790M と C797S は細胞増殖が効果的に抑制され、それぞれ 76%、90%の細胞は死に絶えると予想された。その一方、ゲフィチニブとオシメルチニブでは抑制されない MET クローンは実験開始から 5-10 日後までに大多数を占めると予想され、これは *in vitro* の結果と一致する。このことから、*in silico* シミュレーションは *in vitro* での実際のクローンの動きを正確に反映していると言える。

そこで、この *in silico* モデルを用い、投薬スケジュールの最適化の第一段階として、各薬剤投与の間隔を 5 日間とした Rapid cycling schedule と間隔を 10 日間とした Slow cycling schedule の比較を行った。Rapid cycling schedule では、1) ゲフィチニブとオシメルチニブ各 300nM を 5 日間、2) ゲフィチニブとサボリチニブ各 300nM を 5 日間、3) オシメルチニブとサボリチニブ各 300nM を 5 日間、の 3 つの併剤を 4 サイクル計 60 日間継続した。Slow cycling schedule ではスケジュールのインターバルを 10 日間とし、3 つの併剤を 2 サイクル、計 60 日間とした。この 2 つのスケジュールにおける各クローンの細胞数を *in silico* で予測・比較したが、60 日後の細胞数には有意な違いは見られず、いずれのクローンも 1 日目と比較すると細胞数が増加する結果となり、さらなる最適化が必要であった。今後は様々な投薬条件を検討し、最終的に全てのクローンの増殖を効果的に抑制できる投薬スケジュールを見出す。

Cancer associated fibroblast を利用した tumor microenvironment モデル化の試み

近年の多くの先行研究が示すように、腫瘍細胞は微小環境において様々な異なる種類の細胞から影響を受けている。間質細胞の中でも特に線維芽細胞は、腫瘍細胞に分泌物質を介して刺激を与えるなど、相互に作用しあい腫瘍の悪性化、進展、耐性獲得などに関わっている。所属研究室では MGH で外科的・生検的に採取された肺癌ヒト組織から patient derived fibroblast (PDF)を樹立して banking しているため、これを利用して tumor microenvironment の一部のモデル化を試みた。

具体的には PDF の培養上清 (conditioned media; CM) を利用し、各耐性クローンを 0.5%で親株に混合した isogenic model を 50% CM で培養した。これにより、癌細胞は PDF からの分泌物質でパラクライン的に刺激されるため、限定的ではあるが tumor microenvironment の一部を模倣した。ここでは 4 種類の PDF から採取した CM を利用し、図 2 に示した 28 日間の長期投与実験を同様の条件で繰り返した。その結果、Complete media での培養と比較すると、2 種類の PDF CM においてゲフィチニブとオシメルチニブ投与下での親株の増殖が異常に増加した。本来親株はゲフィチニブとオシメルチニブに感受性であることから、PDF CM との培養により薬効が失われた (癌細胞が EGFR-TKI から rescue された) ということを示している。この Rescue 効果が見られた 2 種類の PDF は他の PDF

と比較して特定のタンパク質群を高く発現・分泌していることも CM を対象とした ELISA 解析から明らかとなり、PDF からの特定の分泌物質が癌細胞を EGFR-TKI から rescue していることが示唆された。

今後の研究計画と展望

- 各薬剤の濃度、組み合わせ、期間、サイクル数などの各パラメータを変化させることで、各条件下での耐性クローンの細胞数を *in silico* でシミュレーションし、全ての耐性クローンの増殖が抑制できる投薬スケジュールを見出す。予測されたスケジュールを樹立した *in vitro* モデルで検証する。さらに、複数の PDF から採取した CM で *in vitro* モデルを培養し、腫瘍微小環境の一部を再現した状況でも腫瘍細胞の増生が抑制できるかを追加で検証する。
- *In vitro* で効果が確認されたスケジュールを *in vivo* で検証すべく、マウス薬物動態試験のデータを基に *in vitro* で最適化された薬剤濃度をマウス血清中で達成できる投与量を算出する。*in vivo* モデルで検証し、いずれのクローンの発生も抑えられるスケジュールを選別する。
- ここで使用した 3 剤では耐性獲得の予防には不十分と判明した場合は、他の TKI や申請者がこれまでに初期肺腺癌悪性化因子として同定した stratifin (SFN) の阻害薬に候補を広げてシミュレーションを行う。
- 最終的には最適化された投薬スケジュールを EGFR 変異陽性肺腺癌患者に適応することで耐性獲得が予防できる可能性を臨床で試験し、患者予後の向上に貢献したい。